

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

ALBERTO ASCOLI

Le professeur Alberto Ascoli est décédé le 28 septembre 1957 à Milan. Avec lui disparaît une des dernières figures de l'époque héroïque de la vaccination BCG.

Dès 1925, à l'Istituto Vaccinogeno Antitubercolare de Milan, il commença à préparer le vaccin BCG à partir d'une souche reçue de M. Calmette et il a été jusqu'à ses derniers jours un propagandiste infatigable de cette vaccination.

Le professeur Ascoli a encore eu la joie de voir réaliser le nouvel Institut vaccinogène antituberculeux qui fut inauguré dans un des quartiers excentriques modernes de Milan le 2 juin 1954.

La vaccination antituberculeuse n'a pas été, cependant, l'unique préoccupation du défunt.

Alberto Ascoli est né à Trieste en 1877. Il fit ses études de médecine à Vienne et après les avoir terminées avec succès, il fut nommé interne au service du professeur Kossel. C'est dans les laboratoires de ce savant (Prix Nobel de médecine) que Ascoli découvrit l'uracyle. Après un stage au laboratoire de chimie médicale dirigé par Ernest Ludwig, Ascoli se rendit à Pavie pour y travailler à la clinique obstétricale du professeur Luigi Mangiagelli. Attaché quelques années plus tard à l'Istituto Sieroterapico Milanese, ses travaux amenèrent la découverte de la thermoprécipitine, utilisée pour le diagnostic du charbon.

Ses études de biochimie ont amené Ascoli à l'immunologie et à la sérologie. On connaît ses travaux originaux sur l'anachorèse. D'après Ascoli tout foyer vaccinal exerce une sorte de rappel vis-à-vis des germes virulents se trouvant dans l'organisme. Par de nombreux travaux expérimentaux sur l'animal, Ascoli s'est efforcé de donner une démonstration de cette anachorèse.

Son activité dans l'enseignement universitaire a eu pour théâtre principal la Faculté de Médecine vétérinaire de Milan. Ayant été obligé de quitter l'Italie pendant la dernière guerre, Ascoli a trouvé une hospitalité bien méritée aux Etats-Unis où il fut professeur de bactériologie et d'immunologie à la Middlesex University, à Waltham (Massachussets), de 1940 à 1943 ; de 1944 à 1946, il se consacra à des recherches sur la brucellose, d'abord à la Rutgers University à New-Brunswick (N. J.) et ensuite au Department of Public Health and Preventive Medicine de l'Université de New-York.

Alberto Ascoli est l'auteur de nombreux livres et publications scientifiques, dont plusieurs ont été traduits en plusieurs langues.

Ses mérites ont été reconnus par plusieurs Académies et Associations scientifiques en Italie et à l'étranger.

Il était membre étranger de la Société de Pathologie comparée de la Faculté de Médecine de Paris et le Gouvernement français lui avait conféré la Légion d'honneur.

La Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur* tient à exprimer ici son profond regret de la disparition d'un des plus anciens propagateurs à l'étranger du vaccin de Calmette et Guérin qui, jusqu'à la fin de sa vie, s'est tenu sur la brèche pour défendre cette découverte française contre d'autres procédés prophylactiques antituberculeux mis en avant par ses propres compatriotes.

Nous présentons nos condoléances sincères à la famille et aux collaborateurs de ce courageux lutteur.

*La Rédaction des Annales de l'Institut Pasteur.*

---

**ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE DE 20 VIBRIONS  
PROVENANT D'AVORTEMENTS BOVINS.  
COMPARAISON AVEC 2 SOUCHES DE *VIBRIO FÆTUS***

par J. GALLUT, J. CHEVÉ et J. GAUTHIER (\*).

(Institut Pasteur,  
Laboratoire du Choléra et Annexe de Laroche-Beaulieu)

Dans un travail antérieur (Gallut [4]), l'un de nous, ayant procédé au fractionnement chimique (par la méthode au phénol) de 10 souches de vibrions d'origines diverses, animale et humaine, répondant aux caractères de *Vibrio fætus*, avait isolé deux fractions antigéniques. La première, insoluble dans le phénol et vraisemblablement polyosidique, fournissait un antisérum qui agglutinait les vibrions homologues et qui se comportait vis-à-vis d'autres souches de *V. fætus* comme l'antisérum préparé avec les vibrions totaux homologues, c'est-à-dire que, les agglutinations croisées étant le plus souvent négatives, cette fraction n'avait qu'une spécificité très restreinte sinon nulle. La seconde fraction, phénol-soluble et donnant les réactions des protéides, fournissait un antisérum précipitant non seulement la fraction homologue mais aussi les fractions hétérologues des vibrions *fætus* dont nous disposions. Nous avons donc conclu à la spécificité de cette fraction protéidique dans l'espèce *V. fætus*.

Nous avons soumis à une étude semblable un certain nombre de vibrions isolés chez des bovins (Chevé et Gauthier). Ces souches provenaient de cas d'avortement. Les tissus embryonnaires ont été cultivés en milieu de Hansen et les isolements faits par passage à travers des bougies Chamberland L3. Toutes ces souches ont présenté les caractères morphologiques, tinctoriaux et biochimiques de *V. fætus*, en particulier, production abondante de catalase, absence de formation d' $H_2S$  et réduction de nitrates.

Les fractions phénol-solubles extraites de ces vibrions ont été confrontées avec les fractions analogues isolées de vibrions *fætus* connus et de vibrions d'espèces étrangères.

(\*) Manuscrit reçu le 16 juillet 1957.



## TECHNIQUES.

A. *Souches* : Nous avons utilisé 26 souches de vibrions comprenant : Deux vibrions *fœtus* connus : n° 5850 (National Collection for Types Cultures) d'origine animale et Am (Institut Pasteur) d'origine humaine.

Vingt vibrions bovins (Chevé et Gauthier) dont les numéros figurent dans les tableaux I et II.

Un vibron *bubulus* (W) [Florent, 1953] saprophyte isolé du sperme d'un taureau.

Deux vibrions d'origine humaine : *V. cholerae* 569 B, pathogène, et *V. El Tor* 47, non pathogène.

Un vibron isolé des eaux de surface : Ez5cp, non pathogène.

B. *Préparation des antigènes* : Chaque souche est cultivée en bouillon pH 7,6, additionné de 10-15 p. 100 d'extrait globulaire. La culture est faite en boîtes de Roux, contenant 100 ml de milieu, maintenues horizontalement pour obtenir une couche de liquide de quelques millimètres d'épaisseur. Après trois ou quatre jours à 37°, la culture est centrifugée, lavée à l'eau physiologique, puis à l'acétone et desséchée dans le vide. Les vibrions secs sont broyés au mortier et mis en suspension dans du phénol à 95 p. 100. Nous avons utilisé le plus souvent une quantité de 0,5 g de vibrions secs et 50 ml de phénol. Après un séjour de vingt-quatre heures à 37°, avec agitation mécanique à trois reprises pendant vingt minutes, la suspension est centrifugée et le culot remis en suspension dans une même quantité de phénol, remplacé à 37°, agité comme ci-dessus et centrifugé après vingt-quatre heures. Les deux surnageants phénoliques réunis sont précipités par addition de deux volumes d'alcool absolu. Le précipité généralement abondant qui se forme aussitôt est lavé trois fois à l'alcool absolu pour éliminer le phénol puis desséché dans le vide après lavage à l'acétone. Après broyage, on dissout la poudre dans de l'eau bidistillée amenée à pH 8,0 par addition de NaOH N/10 et on élimine l'insoluble par centrifugation. La solution est précipitée, au voisinage du point isoélectrique (pH 4,0) déterminé par le minimum de solubilité, en ajoutant de l'acide acétique dilué au 1/50. Ce précipité est redissous à pH 8,0 et les mêmes opérations sont répétées encore deux fois. Le dernier précipité, lavé à l'acétone, est desséché dans le vide. Le rendement final est compris entre 10 et 30 p. 100 du poids sec des vibrions totaux.

C. *Préparation des antisérums* : Chacune des 26 fractions protéidiques, dissoute dans l'eau physiologique à pH 7,0 à la teneur de 1 mg par millilitre, a été injectée par voie intraveineuse à des lapins de 2 à 3 kg à raison de 4 à 6 doses croissantes réparties sur trois semaines environ. La quantité totale injectée est de l'ordre de 5 mg. Les animaux sont saignés sept jours après la dernière injection. Nous n'avons observé que rarement des phénomènes toxiques. Les immun-sérums utilisés précipitent tous, à des dilutions variables, mais jamais inférieures à 1/200, la fraction homologue en solution physiologique à 1 mg de protéide par millilitre.

D. *Réactions des précipitines* : Les antigènes, utilisés en solution physiologique à pH 7,0 (1 mg/ml), et les antisérums (à dilution variable) ont été additionnés de merthiolate à 1 p. 5 000.



Les réactions sont pratiquées par la méthode du disque observé à la limite des deux couches, inférieure de l'antisérum et supérieure de l'antigène, après une heure au bain-marie à 37°. Les résultats considérés comme négatifs ont été obtenus avec les antisérums non dilués.

E. *Dosage des anticorps* : Lorsqu'elle est négative, la réaction des précipitines, pratiquée comme indiqué ci-dessus, suffit à démontrer l'absence de relations sérologiques entre deux fractions données. Par contre, une réaction croisée positive ne permet pas de conclure à l'identité de deux fractions précipitant par le même antisérum. Nous avons donc eu recours, dans les cas où il existait des relations antigéniques entre les fractions des vibrions à identifier et les fractions des *V. foetus* connus, au dosage quantitatif des anticorps de chacun des deux immun sérums *foetus* avec chaque fraction précipitée par lui d'une part, et d'autre part, de chaque immun sérum des fractions à tester avec les fractions Am et 5850 respectivement.

Nous avons utilisé une technique néphélométrique inspirée de celle de Libby [2]. Des quantités fixes (0,5 ml) de sérum pur ou dilué sont mélangées à des quantités croissantes de fraction microbienne (0,2 à 1 mg) dissoutes dans un volume égal (0,5 ml) d'eau physiologique à pH 7,0. Après un séjour de quarante-huit heures à la glacière durant lequel les mélanges sont agités à plusieurs reprises, les précipités sont remis en suspension et l'opacité mesurée au photomètre à cellules sous écran violet (4 000 Å). La taille des particules des précipités étant minime, les suspensions sont suffisamment stables pour permettre des lectures reproductibles dans les cinq minutes suivant la remise en suspension.

On peut ainsi tracer une courbe pour chaque antisérum avec la fraction homologue ou avec les fractions croisées. L'allure de cette courbe correspond sensiblement à celle qu'on obtient en pratiquant le dosage de l'azote des anticorps (suivant la méthode de Heidelberger, sans doute plus rigoureuse mais d'exécution beaucoup plus longue). La zone d'équivalence est déterminée pour chaque courbe par essai des portions des surnageants de chaque mélange sérum-antigène centrifugé, avec le sérum et l'antigène respectivement. Les valeurs fournies par l'opacimétrie au point d'équivalence sont exprimées en pourcentage de la valeur du précipité homologue.

Nous avons d'abord comparé par cette technique les deux fractions des *V. foetus* Am et 5850. Puis pour chacune des fractions extraites des vibrions à déterminer, nous avons pratiqué cinq dosages :

1° et 2° : courbes de précipitation respectives des antisérums des fractions Am et 5850 avec la fraction du vibron à déterminer.

3°, 4° et 5° : courbes de précipitation de l'antisérum de la fraction du vibron testé avec, respectivement, les fractions homologue, Am et 5850.

De plus, nous avons effectué les dosages correspondant aux précipités croisés obtenus exceptionnellement avec les fractions d'espèces étrangères : soit avec le *V. bubulus* W d'une part pour la souche 3887, et avec le seul vibron d'eau Ez5cp d'autre part pour les souches 3598, 3724 et 3745 (en tenant compte du fait constaté que les fractions des trois vibrions *cholerae* El Tor et Ez5cp sont immunologiquement identiques).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION.

A. *Tests de précipitation qualitatifs.* — Les résultats des précipitations directes et croisées obtenues par le test du disque, indiqués dans le tableau I, montrent que :

I. Les fractions protéidiques extraites des deux *V. fœtus* connus ont des rapports sérologiques communs. D'autre part, elles ne

TABLEAU I. — Tests qualitatifs des précipitines.

Fractions phénol- solubles extr. des vibrions	Antisérums des fractions phénol-solubles extraites des vibrions																			
	fœtus		présumés fœtus																non fœtus	
	Am	5850																	bubulus cholerae	El Tor Ez <sup>5</sup> cp
			3245	3281	3427	3498	3583	3598	3609	3610	3620	3621	3622	3630	3632	3724	3745	3797	3800	3830
			3887	4395																
Am	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5850	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3281	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3427	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3498	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3583	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3598	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3609	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3610	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3620	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3621	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3622	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3630	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3632	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3724	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3745	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3797	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3800	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3830	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3887	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4395	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
bubulus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cholerae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
El Tor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ez <sup>5</sup> cp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

précipitent pas avec les quatre antisérums obtenus avec les fractions analogues des vibrions d'espèces étrangères. Réciproquement, les antisérums des fractions *fœtus* sont inactifs sur les fractions des vibrions *bubulus*, *cholerae*, *El Tor* et *Ez<sup>5</sup>cp*. Ceci nous paraît confirmer la spécificité des fractions protéidiques des *V. fœtus* authentiques.



II. Les fractions protéidiques extraites des deux vibrions *fœtus* connus et des 20 vibrions d'origine bovine soumis à l'examen ont fourni avec leurs 22 antisérums une forte majorité de réactions croisées positives. Toutefois, on a pu relever un nombre non négligeable de réactions négatives (130 sur 484, soit 26,8 p. 100). Ceci est dû au fait que les réactions croisées ne sont pas toutes réciproques : certaines fractions se comportant en antigène, d'autres en haptène, suivant que les précipitations croisées sont toutes deux positives ou l'une positive et l'autre négative. Nous pensons donc que les fractions protéidiques des *V. fœtus* constituent des antigènes complexes dont les groupements actifs multiples réagissent ou non avec les différents anticorps des antisérums hétérologues. Pour schématiser cette structure comme nous l'avions fait dans le travail précité [1], où nous avons dénombré (dans la fraction polysidique) six facteurs différents pour dix souches seulement, il faudrait faire intervenir un nombre de facteurs trop important pour qu'une telle classification présente un intérêt pratique.

Sans méconnaître absolument la possibilité d'une dégradation par le phénol de l'antigène protéidique tel qu'il se présente chez le vibron vivant (rançon de toute méthode d'extraction chimique), nous ne retiendrons pas l'objection de Bibberstein [3], pour qui la technique de fractionnement des vibrions par le phénol (déjà utilisée avec succès par Schrivastava, Singh et Ahuja [4]) donnerait lieu à la production d'artefacts, car les réactions fournies par des échantillons de fractions protéidiques d'une même souche mais de préparations différentes nous ont toujours donné des résultats identiques et donc reproductibles.

III. Si la majorité des fractions des vibrions étudiés se comportent comme celles des *V. fœtus* Am et 5850, c'est-à-dire n'ont pas de relations sérologiques avec les vibrions d'espèces étrangères, on peut noter que quatre vibrions font exception, à savoir les vibrions 3598, 3724 et 3797 dont les fractions sont précipitées par les antisérums des quatre fractions *bubulus*, *cholerae*, *El Tor* et *Ez5cp*, mais pas réciproquement, et le vibron 3887 dont l'antisérum précipite la fraction *bubulus* sans réciprocité.

IV. Parmi les quatre vibrions d'espèces étrangères, on peut grouper les *V. cholerae*, *V. El Tor* et le vibron d'eau qui ont des relations réciproques ; par contre, *V. bubulus* est totalement distinct des trois autres.

Des résultats de ces tests qualitatifs on pourrait conclure que les 20 vibrions bovins examinés appartiennent tous à l'espèce *fœtus*, puisque leur fraction protéidique ou son antisérum ont donné des précipitations croisées soit avec l'une des deux fractions analogues des *V. fœtus* Am ou 5850, soit même avec ces



deux fractions. Toutefois le cas des trois vibrions 3598, 3724 et 3797 qui ont des relations antigéniques avec des vibrions étrangers et celui du vibron 3887 dont la fraction est précipitée par l'antisérum *bubulus* devrait faire douter de leur authenticité sinon de la spécificité du test des précipitines.

B. *Tests de précipitation quantitative.* — Les résultats de ces tests fournissent des renseignements plus précis sur le comportement des vibrions étudiés.

I. Les tests croisés préliminaires effectués avec les fractions des vibrions foetus connus Am et 5850 et leurs antisérums respectifs indiquent une légère différence immunologique de ces deux fractions.

On voit en effet, sur la figure 1, que le sérum 5850 donne des courbes pratiquement identiques avec la fraction homologue et la fraction Am, et l'on vérifie que ce sérum saturé par la fraction hétérologue ne précipite plus la fraction homologue 5850.

Par contre, le sérum Am donne une courbe d'opacité de la précipitation hétérologue inférieure à celle de la précipitation homologue, et on vérifie que ce sérum saturé par la fraction 5850 précipite encore la fraction homologue Am. En fait, au point d'équivalence, l'opacité de la précipitation hétérologue n'équivaut qu'à 85 p. 100 de celle de la précipitation homologue. Cette différence de 15 p. 100, si toutefois on la tient pour significative, pourrait indiquer l'existence de certaines variétés immunologiques des diverses souches de *V. foetus*. En l'occurrence, nous aurions affaire à deux types antigéniques différents.

II. Les valeurs opacimétriques obtenues de la même manière, au point d'équivalence, avec les antisérums des fractions des *V. foetus* Am et 5850, respectivement, et chacune des fractions protéidiques des 20 vibrions bovins soumis à l'étude, figurent au tableau II, colonnes 1 et 1'.

Les chiffres qui y sont portés indiquent les pourcentages de l'opacité du précipité hétérologue, allant de 0 (pas de précipitation hétérologue, soit absence de relation sérologique entre le vibron testé et le vibron *foetus* connu) à 100 (précipitation égale à celle fournie par la fraction homologue, soit identité des deux vibrions, *foetus* et testé).

Ces résultats montrent que :

1° Les antisérums des fractions des deux *V. foetus* connus n'ont précipité au taux maximum que certaines fractions, à savoir :

a) Antisérum Am : aucune fraction ;

b) Antisérum 5850 : fractions 3281, 3427, 3498, 3583, 3598, 3609, 3622, 3632, 3745, 3797, 3830 et 4395.

2° Les autres précipités sont tous inférieurs au taux homologue et même nuls pour les vibrions 3245 et 3632 vis-à-vis de l'anti-

TABLEAU II. — Résultats fournis par le dosage des anticorps.

Fraction testée souche n°	Relations avec la fraction extraite de <i>V. foetus</i> Am			Relation avec la fraction extraite de <i>V. foetus</i> 5850			Conclusion
	(1)	(2)	(3)	(1')	(2')	(3')	
3245	0	34	(A)	0	16	(A)	<i>V. foetus</i> IV
3281	35	40	(A)	100	40	(A)	<i>V. foetus</i> II
3427	32	37	(A)	100	35	(A)	<i>V. foetus</i> II
3498	42	100	A	100	20	(A)	<i>V. foetus</i> III
3583	14	100	A	100	75	(A)	<i>V. foetus</i> III
3598	60	25	(A)	100	15	(A)	<i>V. foetus</i> II
3609	18	37	(A)	100	37	(A)	<i>V. foetus</i> II
3610	14	33	(A)	0	12	(A)	<i>V. foetus</i> IV
3620	8	43	(A)	0	10	(A)	<i>V. foetus</i> IV
3621	27	100	A	0	31	(A)	<i>V. foetus</i> I
3622	27	100	A	100	100	A	<i>V. foetus</i> III
3630	27	13	(A)	0	11	(A)	<i>V. foetus</i> IV
3632	0	47	(A)	100	100	A	<i>V. foetus</i> II
3724	51	6	(A)	0	2	(A)	<i>V. saprophyte</i>
3745	32	100	A	100	100	A	<i>V. foetus</i> III
3797	14	100	A	100	27	(A)	<i>V. foetus</i> III
3800	25	23	(A)	0	41	(A)	<i>V. foetus</i> IV
3830	57	32	(A)	100	29	(A)	<i>V. foetus</i> II
3887	7	7	(A)	50	13	(A)	<i>V. indéterminé</i>
4395	29	10	(A)	100	0	H	<i>V. foetus</i> II

N. B. — La valeur de chaque précipité croisé est exprimée en pourcentage de la densité optique du précipité homologue. Le chiffre 100 indique l'identité de la fraction testée et de la fraction homologue ; les chiffres inférieurs indiquent des relations partielles ou nulles (0).

(1) et (1') : précipité produit par l'antisérum de la fraction *V. foetus* (Am ou 5850) avec la fraction du vibron testé. (2) et (2') : précipité produit par l'antisérum de la fraction testée par la fraction *foetus*. (3) et (3') A : antigène complet, (A) : antigène partiel, H : haptène.

sérum Am, et pour les vibrions 3245, 3610, 3620, 3621, 3630, 3724 et 3800 vis-à-vis de l'antisérum 5850.

III. Dans les colonnes 2 et 2' du tableau II figurent, en pourcentages d'opacité du précipité homologue, les valeurs fournies par la précipitation des fractions extraites des *V. foetus* Am et 5850 par les antisérums des fractions protéidiques de chacun des 20 vibrions bovins.

On peut y voir que :

1° Les fractions des *V. fœtus* connus sont précipitées au taux homologue par un certain nombre d'antisérums des fractions testées, soit :

a) La fraction Am par les antisérums 3498, 3583, 3621, 3622, 3745 et 3797 ;

b) La fraction 5850 par les antisérums 3622, 3632 et 3745.

2° Les autres antisérums ont donné des résultats très inférieurs aux taux homologues ; aucun n'est nul pour la fraction Am, par contre la fraction 5850 n'est pas précipitée par l'antisérum 4395 et très faiblement (2 p. 100) par l'antisérum 3724.

IV. Nous avons indiqué dans les colonnes 3 et 3' du tableau II le comportement immunologique des fractions protéidiques extraites des 20 vibrions bovins vis-à-vis des fractions analogues extraites des deux vibrions *fœtus*, tel qu'il ressort de ces dosages d'anticorps. Le signe A indique que la fraction testée se comporte en antigène complet, le signe (A) en antigène partiel et le signe H en haptène.

V. En ne considérant que les seuls tests où la valeur opacimétrique du précipité hétérologue est égale à celle du précipité homologue (dans la zone d'équivalence), et où le sérum saturé par la fraction hétérologue ne précipite plus par la fraction homologue, nous retiendrons d'abord 13 vibrions, sur les 20 examinés. Nous estimons que ces 13 vibrions peuvent être tenus pour des *V. fœtus* authentiques. Ils se répartissent en trois groupes, suivant qu'ils s'identifient soit à un seul des deux vibrions *fœtus* de référence, soit aux deux :

Groupe I, apparenté au vibron Am : 1 vibron, n° 3621.

Groupe II, apparenté au vibron 5850 : 7 vibrions, n°s 3281, 3427, 3598, 3609, 3622, 3830 et 4395.

Groupe III, mixte : 5 vibrions, n°s 3498, 3583, 3622, 3745 et 3797.

VI. Les 7 vibrions restants (3245, 3610, 3620, 3630, 3724, 3800 et 3887) ne peuvent être tenus *a priori* pour *V. fœtus*, leurs fractions s'étant comportées en antigène partiel ou en haptène vis-à-vis des antisérums Am et 5850, et leurs antisérums n'ayant jamais été saturés totalement par les fractions *fœtus*.

VII. Les figures 2, 3 et 4, qui montrent les courbes des précipitations directes et croisées de trois vibrions différents (3621 du groupe I, 3622 du groupe III et 3630 encore indéterminé) pris comme exemples, illustrent graphiquement leur comportement immunologique.

VIII. Les fractions des quatre vibrions (n°s 3598 et 3797, tenus pour *V. fœtus* III, et n°s 3724 et 3887 encore indéterminés), qui



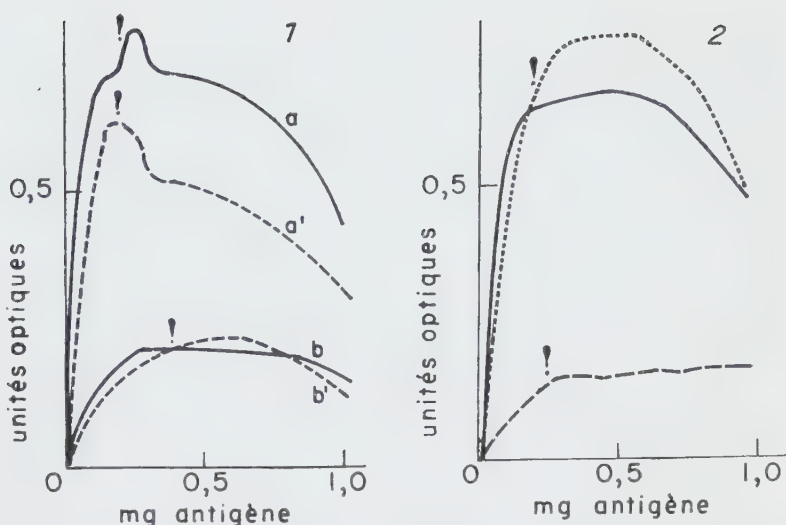


FIG. 1. — Courbes de précipitation des antisérums des fractions protéidiques des *V. fetus* Am et 5850. a) : antisérum Am et fraction homologue; a') : antisérum Am et fraction 5058; b) : antisérum 5058 et fraction homologue; b') : antisérum 5850 et fraction Am; ! : point d'équivalence.

FIG. 2. — Courbes de précipitation de l'antisérum de la fraction protéidique du vibron n° 3621. (*V. fetus* I). — : précipitation de la fraction homologue; — — — : précipitation de la fraction Am; . — . — . : précipitation de la fraction 5850; ! : point d'équivalence.

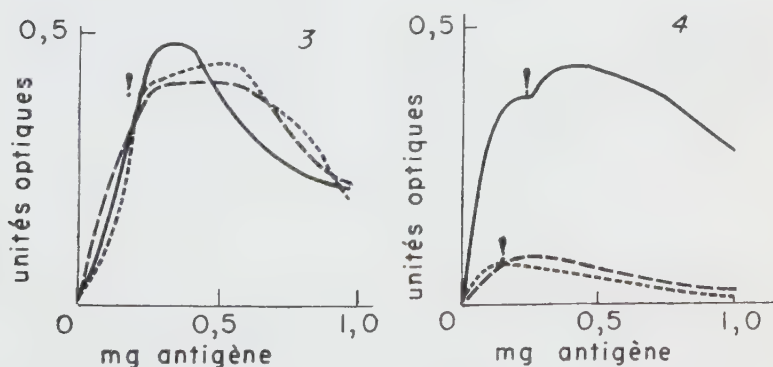


FIG. 3. — Courbes de précipitation de l'antisérum de la fraction protéidique du vibron 3622 (*V. fetus* III). — : précipitation de la fraction homologue; — — — : précipitation de la fraction Am; . — . — . : précipitation de la fraction 5850; ! : point d'équivalence.

FIG. 4. — Courbes de précipitation de l'antisérum de la fraction protéidique du vibron n° 3630 (*V. fetus* IV). — : précipitation de la fraction homologue; — — — : précipitation de la fraction Am; . — . — . : précipitation de la fraction 5850; ! : point d'équivalence.

avaient donné, aux tests qualitatifs, des précipitations croisées avec des vibrions étrangers à l'espèce *fœtus*, ont été soumises à des tests quantitatifs complémentaires vis-à-vis des antisérums du *V. bubulus* et du vibron d'eau d'une part, et les antisérums des quatre vibrions bovins précités ont été testés par les fractions *bubulus* et *Ez5cp* d'autre part. Les résultats de ces tests figurent au tableau III (sous la même disposition que celle adoptée dans le tableau II). Ils montrent que :

1° Vis-à-vis du vibron *bubulus* (colonnes 1, 2 et 3) les fractions des trois premiers vibrions (3598, 3724 et 3797) se comportent partiellement en haptène, la quatrième (3887) comme

TABLEAU III. — Relations avec *V. bubulus* et vibron d'eau.

Fraction testée couche n°	Relations avec la fraction du <i>V. bubulus</i> W			Relations avec la fraction du vibron d'eau Ez5cp		
	(1)	(2)	(3)	(1')	(2')	(3')
3598	33	0	H	25	40	(A)
3724	50	0	H	1	100	A
3797	62	0	H	13	40	(A)
3887	0	3	(A)	0	0	—

(1) et (1') : précipités de la fraction testée avec l'antisérum *bubulus* et l'antisérum Ez5cp, respectivement. (2) et (2') : précipités de l'antisérum de la fraction testée avec les fractions *bubulus* et Ez5cp, respectivement. (3) et (3') A : antigène complet, (A) : antigène partiel, H : haptène.

un très faible antigène (3 p. 100). Comme, par ailleurs, aucune relation antigénique n'existe entre le *V. bubulus* et les deux *V. fœtus* (pas plus qu'avec *V. cholerae*, *V. El Tor* ou le vibron d'eau), nous estimons que *V. bubulus*, qui du point de vue cultural et biochimique aussi se différencie de *V. fœtus*, appartient bien à une espèce immunochimique particulière.

2° Vis-à-vis du vibron d'eau Ez5cp, on constate (colonnes 1', 2' et 3') que seule la fraction 3724 a été précipitée au taux homologue par l'antisérum du vibron d'eau. Les autres précipitations sont seulement partielles.

D'après les critères adoptés plus haut (voir § V), nous admettons donc que :

a) Le vibron 3724, dont la fraction protéidique n'a que des relations sérologiques partielles avec la fraction homologue du

*V. foetus* Am et aucune avec celle du *V. foetus* 5850, mais précipite au taux homologue avec l'antisérum de la fraction du vibrion d'eau, est très vraisemblablement un vibrion banal saprophyte.

b) L'appartenance à l'espèce *foetus* des vibrions 3598 et 3797 n'est pas à remettre en discussion puisqu'ils n'ont que des relations partielles avec le vibrion Ez5cp.

c) Le vibrion 3887, qui a des rapports antigéniques partiels avec les deux *V. foetus* et aussi avec le *V. bubulus*, reste indéterminé. L'histoire clinique de cette souche n'est d'ailleurs pas en faveur d'une affection à *V. foetus*. Il s'agissait d'un veau mort-né à terme ; seule la culture du placenta a été positive dans 2 tubes sur 6, les cultures des organes (estomac, cerveau, sang du cœur) ont été négatives. L'étable contient 7 bêtes et il y a eu 3 avortements dont 2 liés à la brucellose ou à des carences alimentaires. Il n'y a jamais eu de stérilité. La souche avait été considérée comme *V. foetus* en raison des caractères morphologiques, tinctoriaux et culturels. Elle ne produisait pas d' $H_2S$  et la recherche de la catalase était positive. Ce cas particulier montre que nos critères de caractérisation sont encore insuffisants et peuvent parfois entraîner des erreurs que seule la sérologie permet de rectifier.

IX. Ayant ainsi écarté les deux vibrions 3724 et 3887, nous estimons que les 5 souches restantes (3245, 3610, 3620, 3630 et 3800) qui ont avec les deux *V. foetus* authentiques des rapports antigéniques partiels mais exclusifs, peuvent être considérées comme appartenant à cette même espèce. Le fait que les deux souches arbitrairement choisies comme étalons ne sont pas strictement identiques nous permet, en effet, de supposer que les 5 vibrions précités peuvent s'apparenter à une troisième souche de *V. foetus* que nous aurions tout aussi bien pu choisir. Nous avons donc fait figurer nos 5 derniers vibrions, dans le tableau II, comme du type IV, sans préjuger de la possibilité d'un démembrement ultérieur de ce quatrième groupe.

#### RÉSUMÉ.

Vingt vibrions provenant d'avortements bovins ont été soumis à une étude immunochimique qualitative et quantitative. La comparaison sérologique des fractions protéïdiques extraites de ces vibrions avec les fractions analogues extraites de 2 vibrions *foetus* connus et de 4 vibrions d'espèces étrangères (*V. bubulus*, *V. cholerae*, *V. El Tor* et vibrion d'eau) a permis de classer comme suit les 20 souches d'origine bovine :

a) 18 vibrions considérés comme des *V. foetus* authentiques, parmi lesquels 13 dont les fractions protéïdiques (ou leurs antisérums) ont donné avec l'antisérum des fractions analogues de



l'un ou l'autre des *V. fetus* connus (ou ces fractions elles-mêmes) des précipités égaux, dans la zone d'équivalence, aux précipités homologues, et 5 à taux de précipitation croisée inférieurs ;

b) 1 vibron apparenté au vibron d'eau et tenu pour saprophyte banal ;

c) 1 vibron n'ayant que des rapports partiels avec *V. fetus*, mais en ayant aussi avec *V. bubulus*, considéré comme indéterminé tant du point de vue immunochimique que clinique.

Ces résultats confirment la spécificité de la fraction protéidique de *Vibrio fetus* et indiquent l'existence de variétés sérologiques de ce vibron.

## SUMMARY

### IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON 20 STRAINS OF VIBRIO ISOLATED FROM BOVINE ABORTION CASES.

Qualitative and quantitative immunochemical study of 20 vibrios isolated from bovine abortion cases.

A serological comparison has been carried out between the protein fractions of these vibrios and analogous fractions extracted from two *Vibrio fetus* and from vibrios belonging to four other species (*V. bubulus*, *V. cholerae*, *V. El Tor* and water vibrio). This comparison has allowed to classify the 20 bovine strains as follows :

a) 18 strains can be considered as belonging to the species *V. fetus* : the protein fractions of 13 of them gave with the immune serum of analogous fractions extracted from the two *V. fetus* strains, precipitates which, in the equivalent zone, were similar to homologous precipitates ; for the 5 other ones, the titer of precipitation was lower than with homologous strains or immune sera.

b) One strain related to the water vibrio turned out to be a saprophyte.

c) One strain only partially related to *Vibrio fetus*, was also related to *V. bubulus*, and should be considered as undetermined clinically as well as immunochemically.

These results confirm the specificity of the protein fraction of *V. fetus* and point out the existence of serological variants of this vibrio.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 455.
- [2] LIBBY (R. L.). *J. Immunol.*, 1938, **34**, 71 et 269.
- [3] BIBBERSTEIN (E. L.). *Cornell Vet.*, 1956, **46**, 144.
- [4] SCHRIVASTAVA (D. L.), SINGH (G.) et ABUJA (M. L.). *Ind. J. med. Res.*, 1948, **36**, 409.

# MÉTABOLISME DES MYCOBACTÉRIES SENSIBLES ET RÉSISTANTES A L'INH.

## ACTIVITÉ AMINO-ACIDE OXYDASIQUE (PRODUCTION D'EAU OXYGÉNÉE).

par A. ANDREJEW et A. TACQUET (\*).

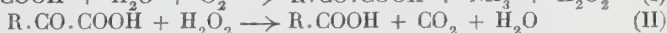
(Institut Pasteur de Lille)

Certaines souches de Mycobactéries adaptées à l'INH (hydrazide de l'acide isonicotinique) perdent complètement ou en grande partie leur activité catalasique [1, 2 a] et peroxydasique [2 b], mais possèdent les cytochromes *a*, *b* et *c*, ainsi qu'une activité cytochrome-oxydasique [2 c]. Ainsi, dans les mêmes conditions de culture, parmi les enzymes ou cofacteurs héminiques, l'adaptation à l'INH inhibe principalement la formation des enzymes détruisant l'eau oxygénée (catalase, peroxydase). On sait, d'autre part, que les souches adaptées à l'INH résistent moins bien que les souches sensibles à l'INH, à l'effet toxique de  $H_2O_2$  [3].

Dans ces conditions, nous nous sommes demandé si les Mycobactéries adaptées à l'INH produisaient de l'eau oxygénée.

On sait que certaines oxydases (D- et L-amino-acide oxydases, xanthine oxydase, glucose oxydase et autres), étudiées à l'état isolé, réagissent directement avec  $O_2$  moléculaire, en le réduisant en  $H_2O_2$ .

La formation de  $H_2O_2$ , impliquée dans ces systèmes, peut être mise en évidence suivant la méthode de Keilin et Hartree [4], qui ont remarqué qu'en l'absence de la catalase et en présence de la D-amino-acide oxydase, la consommation de  $O_2$ , lors de l'oxydation de la D-alanine, est doublée par rapport à la quantité calculée d'oxygène nécessaire à l'oxydation de ce substrat. D'après Negelein et Brömel [5], il se produit, dans ces conditions, une réaction spontanée (non enzymatique) entre deux produits d'oxydation,  $H_2O_2$  et acide pyruvique, avec formation d'acide acétique, de  $CO_2$  et de  $H_2O$  :



(\*) Manuscrit reçu le 16 juillet 1957.

Lorsqu'on ajoute de la catalase à ce système, la consommation de  $O_2$  diminue de moitié :  $H_2O_2$  formée à la suite de la réaction I est décomposée et la réaction II n'a donc pas lieu. Dans ce cas la réaction devient :



Mais si l'on ajoute, à la fois, la catalase et l'éthanol, la consommation de  $O_2$  redevient double : il se produit une oxydation préférentielle de l'alcool à la place de l'acide pyruvique. Cette oxydation couplée de l'éthanol [4] résulte de l'activité peroxydasique de la catalase et s'effectue suivant la réaction :



La désamination oxydative de l'alanine et l'oxydation couplée de l'éthanol [4] ont été notamment étudiées chez les anaérobies (*Cl. sporogenes*) par Aubel, Rosenberg et de Chezelles [6], ainsi que par Rosenberg et Nisman [7], et chez les aérobies, en particulier chez certaines Mycobactéries, par l'un de nous en collaboration avec Rosenberg [8 a].

Le présent travail est consacré à l'étude de ce problème chez certains mutants des Mycobactéries résistants à l'INH, ainsi qu'à l'étude de l'effet direct de l'INH, de la streptomycine, du PAS (acide para-amino-salicylique) et de la D-cyclosérine sur l'activité des L- et D-amino-acide oxydases.

#### MÉTHODES.

La consommation de  $O_2$  est mesurée dans l'appareil de Warburg, à 37°, en atmosphère d'air. La composition des fioles est donnée au bas des figures et tableaux.

Comme précédemment [2 c], les bactéries sont cultivées sur milieu de Löwenstein, additionné ou non d'INH.

L'homogénat du cortex de rein de mouton est préparé dans un peu de KCl 0,154 M, à 0°, à l'aide d'un homogénéiseur du type Potter-Elvehjem. Après une centrifugation, à froid, d'une heure à 20 000 g, on obtient le surnageant (poids sec : 39,6 mg/ml) utilisé dans ce travail.

La D-amino-acide oxydase est préparée à partir d'une poudre acétonique du cortex de rein de mouton et purifiée jusqu'à l'étape 4, suivant le procédé de Negelein et Brömel, rapporté par Burton [9]. Cette préparation est dialysée, à + 4°, contre le tampon pyrophosphate 0,016 M, pH 8,3. Pour mesurer l'activité de cet enzyme nous employons la DL-alanine, comme substrat, car l'isomère L- n'est pas oxydé d'une façon appréciable par les extraits aqueux des poudres acétoniques des tissus animaux [9].

Les broyats de bactéries sont faits à froid (0°), en présence de sable.



Les poudres acétoniques de bactéries sont préparées d'après Potter [10].

Les dosages de  $\text{NH}_3$  sont faits au microkjeldahl.

Les amino-acides employés proviennent des établissements Hoffmann-La Roche.

### RÉSULTATS.

Le BCG C nous a paru particulièrement intéressant, puisqu'il a été obtenu à partir d'un seul élément, isolé au micromanipula-

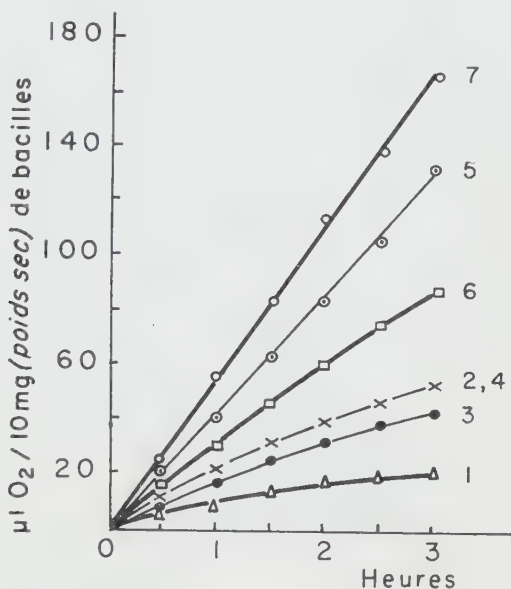


FIG. 1. — BCG C sensible à l'INH. Conditions expérimentales dans les deux cas (fig. 1 et 2) : tampon  $\text{PO}_4\text{KH}_2 + \text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ , 0,03 M, pH 7,2. Volume total : 2,0 ml. Cupule centrale : 0,2 ml. de KOH à 20 p. 100 + papier. DL-sérine (100 µM) ajoutée au temps 0. 1) Suspension bacillaire-témoin (endogène) ; 2) + catalase (en excès) ; 3) + éthanol 0,01 M ; 4) + catalase + éthanol ; 5) + DL-sérine ; 6) + DL-sérine + catalase ; 7) + DL-sérine + catalase + éthanol.

teur, et dédoublé en BCG C sensible et BCG C résistant à l'INH (entretenu depuis plus d'un an sur milieu de Löwenstein + INH).

Les figures 1 et 2 donnent, respectivement, les résultats obtenus avec BCG C sensible à l'INH (Kat.f. = 0,4) et BCG C résistant à 100 µg d'INH/ml (Kat.f. = 0-0,005).

Dans les deux cas, la consommation de  $\text{O}_2$ , en présence de l'acide aminé, de la catalase et de l'éthanol (courbe 7, fig. 1 et 2)

est pratiquement doublée, par rapport à celle obtenue en présence de l'acide aminé et de la catalase (courbe 6, fig. 1 et 2), le rapport  $\mu\text{Atomes O}/\mu\text{Moles NH}_3$  étant de 2,2-2,4.

L'essai de la réduction du DPN (diphosphopyridine nucléotide), à 340  $\mu\mu$ , effectué avec les broyats de ces cultures, en présence du tampon pyrophosphate 0,12 M pH 8,4, de KCN 0,05 M, de

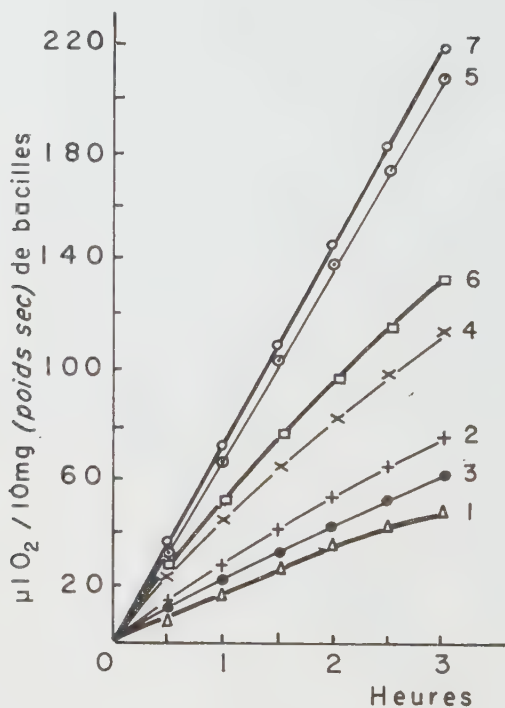


FIG. 2. — BCG C résistant à 100  $\mu\text{g}$  d'INH.

$\text{MnCl}_2$  0,0003 M et de l'éthanol 0,007 M n'a montré qu'une activité négligeable ou nulle de l'éthanol déshydrogénase, enzyme susceptible d'interférer avec le système étudié en ce qui concerne l'oxydation couplée de l'alcool.

Ces expériences ont été faites avec des cultures de BCG C âgées de 3 semaines et laissées en suspension aqueuse à + 4° pendant quatre jours. Ce traitement semble avoir assuré l'accessibilité de la catalase au système étudié (fig. 1 et 2), puisque le  $\Delta\text{QO}_2$  de la même souche (BCG C résistant à 100  $\mu\text{g}$  d'INH/ml) non traitée de cette façon, peut ne pas être diminué par la catalase ajoutée (exp. 6, 7, 8 du tableau I), sans qu'il y ait de varia-

TABLEAU I.

		µl O <sub>2</sub> consommées par 10 mg (poids sec) de bacilles																																	
		Heures																																	
		H 37 Ra sensible à l'I.N.H.		H 37 Ra résistant à 100 γ d'I.N.H./ml		H 37 Ra résistant à 100 γ d'I.N.H./ml		B.C.G. C sensible à l'I.N.H.		B.C.G. C résistant à 100 γ d'I.N.H./ml		B.C.G. C résistant à 100 γ d'I.N.H./ml		B.C.G. C résistant à 100 γ d'I.N.H./ml		B.C.G. C résistant à 100 γ d'I.N.H./ml		B.C.G. C résistant à 100 γ d'I.N.H./ml		Aviaire B sensible à l'I.N.H.		Aviaire B résistant à 500 γ d'INH /ml		Aviaire B résistant à 500 γ d'INH /ml		Aviaire B résistant à 500 γ d'INH /ml		M. phlei 525 sensible à l'I.N.H.		M. phlei 525 rés. à 2000 γ d'I.N.H./ml		M. Grassberger sensible à l'I.N.H.		M. Grassberger rés. à 500 γ d'INH /ml	
Age (Jours)		13	13	20	21	22	11	25	25	25	18	18	29	29	7	7	11	8																	
n°		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																	
Endogène	1	73		145	10	17	52	18	13	18	19	46	27	22	21	83	114	59																	
	2	119	182	253	19	35	99	29	25	29	31	77	46	44	36	154	238	95																	
	3	152	249			48		39	34	38		107	58	61			340	123																	
Catalase	1	85		155	20	28	56	21	13	19	19	54	21	38	35	85	130	81																	
	2	138	189	288	37	55	107	32	28	30	33	93		66	62	160	261	121																	
	3	177	275			77		43	39	40		131	51	88			367	152																	
Ethanol 0,01 M	1	83		184	20	24	60	23	16	23	18	49	29	31	53	94	144	106																	
	2	136	194	319	40	43	114	38	32	39	32	86	48	58	115	183	314	269																	
	3	174	276			62		52	45	53		120	63	77			485	485																	
Catalase + Ethanol 0,01 M	1	81		191	23	44	57	25	21	23	18	61	26	33	72	113	145	113																	
	2	132	192	349	41	81	108	43	43	40	35	100	44	62	163	230	321	266																	
	3	171	280			115		59	63	56		140	57	86			493	480																	
Acide aminé 0,05 M	1	91		183	42	67	71	36	44	23	21	58	34	25	115	92	171	236																	
	2	156	206	336	84	140	139	75	90	39	44	96	58	56	276	185	336	386																	
	3	213	292			209		112	131	55		132	81	81			472	492																	
Acide aminé 0,05 M + Catalase	1	97		159	30	53	74	37	41	23	22	50	25	31	124	102	182	230																	
	2	171	212	313	62	101	145	79	87	40	46	91	46	65	272	203	356	373																	
	3	233	296			136		119	128	57		130	66	94			498	472																	
Acide aminé 0,05 M + Ethanol 0,01 M	1	104		175	48		74	39	40	30	23	54	55	31	120	113	195	234																	
	2	189	204	309	98		144	82	85	55	48	98	80	62	282	237	410	452																	
	3	266	293					126	127	84		140	99	88			619	638																	
Acide aminé 0,05M + Catalase + Ethanol 0,01 M	1	103		182	57	69	75	43	44	29	25	62	56	33	143	145	213	239																	
	2	179	209	337	113	146	145	89	94	55	49	113	84	65	344	297	442	452																	
	3	250	302			217		134	139	83		164	103	93			664	626																	

Exp. : 1, 2, 3, 7 : DL-sérine (100 µM) ; 4, 5, 6, 8 : L-sérine (100 µM) ; même composition des fioles que les fig. 1 et 2, les autres : DL-alanine (100 µM).



tion de  $O/NH_3$ . Notons cependant que, dans de nombreux cas, les bactéries ainsi traitées continuaient à manifester une perméabilité déficiente et un métabolisme endogène élevé.

Comme les bacilles tuberculeux sensibles à l'INH possèdent en général une activité catalasique relativement faible [2 b] et comme les mêmes bactéries INH-résistantes la perdent complètement ou en grande partie [4], il semble que la consommation de  $O_2$  puisse être déjà doublée en présence de l'acide aminé, suivant les réactions I et II ; l'éthanol peut donc dans ce cas ne pas l'augmenter.

Après les travaux de Keilin et Hartree [4], on sait, en effet, qu'en présence d'une quantité insuffisante de catalase la consommation de  $O_2$  par ce système est augmentée par rapport à la quantité exigée par la réaction III et qu'une partie plus ou moins importante de céto-acide disparaît suivant la réaction II. On sait également [4], que la quantité de catalase nécessaire pour assurer l'oxydation couplée de l'éthanol par  $H_2O_2$  formée est environ mille fois plus importante que celle nécessaire pour la décomposition catalasique de  $H_2O_2$ .

Comme le montrent les tableaux I et II, ainsi que les expériences non rapportées, le  $QO_2$  des Mycobactéries intactes est augmenté aussi bien par la L-sérine que par la DL-sérine, par la L-alanine aussi bien que par la DL-alanine.

TABLEAU II.

$\mu l$ $O_2$ consommé par 10 mg (poids sec) de bacilles en une heure.	
1. BCG C sensible à l'INH, âgé de 26 jours.	
Suspension bacillaire :	
+ catalase .....	10,7
+ catalase + INH (1 000 $\mu g/ml$ ) .....	14,0
+ catalase + L-sérine .....	18,9
+ catalase + L-sérine + INH (1 000 $\mu g/ml$ ) .....	18,3
2. BCG C sensible à l'INH, âgé de 11 jours.	
Suspension bacillaire :	
+ catalase .....	53,6
+ catalase + INH (1 000 $\mu g/ml$ ) .....	56,6
+ L-sérine .....	70,6
+ catalase + L-sérine .....	71,1
+ catalase + L-sérine + INH (1 000 $\mu g/ml$ ) .....	60,5
Composition de base des fioles : suspension bacillaire ; tampon $PO_4KH_2 + PO_4Na_2H$ 0,03 M, pH 7,2, forte solution de catalase. Volume total : 2,0 ml. Cupule centrale : 0,2 ml de KOH à 20 p. 100 + papier. L-sérine (100 $\mu M$ ) ajoutée au temps 0.	

D'autre part, nous n'avons pas obtenu d'augmentation du  $QO_2$ , en présence de la DL-alanine avec la poudre acétonique de H37Ra (sensible à l'INH).

Etant donné la faible activité amino-acide oxydasique des bacilles tuberculeux, nous n'avons pas réussi à améliorer les

résultats obtenus avec certaines cultures, aussi bien sensibles que résistantes à l'INH, en employant les broyats ou les poudres acétoniques de ces bacilles.

Cependant, même si l'oxydation couplée de l'éthanol (réaction IV) ne peut être obtenue, dans ces conditions, avec certaines cultures de Mycobactéries, les résultats observés permettent de penser que les réactions I et II ont lieu aussi bien dans les Mycobactéries sensibles que dans les Mycobactéries résistantes à l'INH.

Ainsi, pour une même souche de Mycobactéries (exemple : BCG C), l'INH, tout en inhibant la formation de la catalase et de la peroxydase, n'empêche pas celle du système amino-acide oxydasique, qui implique la production de  $H_2O_2$ .

On sait qu'avec les Mycobactéries, tout au moins sensibles à l'INH, on obtient une accumulation relativement forte de céto-acides [8 b], aussi bien dans certaines conditions expérimentales qu'au cours de la croissance. Il semble donc que la quantité de  $H_2O_2$  formée par ces bactéries soit insuffisante pour oxyder tous les céto-acides produits.

Nous avons vu, d'autre part, que dans certains cas (par exemple *M. phlei* 525 ; exp. 14, tableau I), à côté d'une consommation de  $O_2$  fortement accrue en présence de DL-alanine, de catalase et d'éthanol, la quantité de  $NH_3$  trouvée était relativement faible (rapport  $\mu At. O/\mu M NH_3$  : 2,8-3,2). Il est donc nécessaire d'envisager la coexistence d'autres mécanismes interférents, notamment de l'éthanol déshydrogénase (que nous n'avons cependant pas réussi à mettre en évidence chez *M. phlei*), des transaminations (suivies d'oxydations), ainsi que la possibilité d'utilisation de  $NH_3$  formé par ces bactéries (dont le métabolisme endogène est très élevé).

Notons également de très grandes variations d'affinité pour les différents acides aminés suivant les souches [8 a]. Par exemple, le  $QO_2$  du BCG C est augmenté par la sérine, tandis que ni l'alanine, ni la sérine n'ont influencé le  $QO_2$  du BCG Phipps, au cours de ce travail.

D'autre part, l'augmentation du  $QO_2$  des bacilles tuberculeux, provoquée par un acide aminé, était trop faible dans certains cas pour que  $NH_3$  formé puisse être correctement dosé au moyen du microkjeldahl.

Tout en nous réservant d'examiner certains problèmes, notamment celui des transaminations chez les Mycobactéries au cours d'autres études, il nous a donc paru nécessaire de compléter ce travail par une étude de l'effet direct de l'INH sur l'activité amino-acide oxydasique du BCG C sensible et résistant à l'INH et surtout sur la forte activité amino-acide oxydasique des préparations obtenues à partir du cortex de rein de mouton.

Le tableau II (exp. 1) montre que, dans le cas d'une culture de BCG C sensible à l'INH, âgée de 26 jours, l'INH (1 000  $\mu\text{g/ml}$ ) n'exerce aucun effet sur le  $\Delta\text{QO}_2$  (accroissement de la respiration), obtenu en présence de L-sérine et d'un large excès de catalase « accessible ». Une culture de cette même souche, âgée de 11 jours (exp. 2) et mise en présence de L-sérine et de catalase (qui, cette fois, n'accède pas au système), donne un  $\Delta\text{QO}_2$  que l'INH (1 000  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibe en partie. Il est possible d'ailleurs que cette inhibition concerne non pas l'oxydation de l'acide aminé même, mais celle du métabolite qui en est issu.

Les expériences suivantes, faites avec les extraits du cortex de rein de mouton, contribuent à répondre à cette question.

Le tableau III donne quelques résultats obtenus avec le surnageant de l'homogénat du cortex de rein de mouton (ayant une forte activité catalasique), additionné de L-alanine et d'INH, de streptomycine, de PAS ou de D-cyclosérine. A l'exception d'une légère inhibition obtenue en présence du PAS, ces substances n'exercent aucun effet inhibiteur sur ce système. Dans ces conditions d'expérience, l'INH, au contraire, l'exalte faiblement.

TABLEAU III.

1. Homogénat (surnageant) de cortex de rein de mouton :	$\text{QO}_2$
+ L-alanine .....	8,8
+ L-alanine + INH (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	9,9
+ L-alanine + INH (5 000 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	9,8
+ L-alanine + streptomycine (5 000 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	8,7
+ L-alanine + PAS (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	8,1
+ L-alanine + PAS (5 000 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	7,7
+ L-alanine + D-cyclosérine (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	8,3
2. Homogénat (surnageant) de cortex de rein de mouton :	
+ L-alanine .....	8,8
+ L-alanine + INH (500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	9,9
+ L-alanine + INH (1 000 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	9,8
+ L-alanine + INH (1 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	9,9
+ L-alanine + streptomycine (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	9,2
+ L-alanine + PAS (1 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	8,8

Composition de base des fioles : homogénat (surnageant) du cortex de rein de mouton ; tampon phosphates 0,03 M, pH 7,2. Volume total : 2,0 ml. Cupule centrale : 0,2 ml de KOH à 20 p. 100 + papier. Au temps 0 : 100  $\mu\text{M}$  de L-alanine.

D'autre part, la L-amino-acide oxydase, purifiée d'après Blanchard et coll [11], jusqu'à l'étape 2, n'est pas inhibée par l'INH.

Le tableau IV donne les résultats obtenus avec la D-amino-acide oxydase, que nous avons préparée à partir de la poudre acétonique du cortex de rein de mouton et additionnée de FAD



(flavine adénine dinucléotide). L'INH, la streptomycine et la D-cyclosérine n'exercent pas d'effet sur l'activité de la D-amino-acide oxydase. A la même concentration (2 500  $\mu\text{g/ml}$ ) le PAS semble l'inhiber très légèrement.

TABLEAU IV.

$\mu\text{l O}_2$  consommés (en quatre-vingt-dix minutes).

1. D-amino-acide oxydase :	
+ DL-alanine .....	565
+ DL-alanine + INH (2 000 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	580
+ DL-alanine + catalase .....	295
+ DL-alanine + catalase + INH (2 000 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	280
$\mu\text{l O}_2$ consommés (en soixante minutes).	
2. D-amino-acide oxydase :	
+ DL-alanine + catalase .....	255
+ DL-alanine + catalase + INH (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	233
+ DL-alanine + catalase + D-cyclosérine (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	262
$\mu\text{l O}_2$ consommés (en soixante minutes).	
3. D-amino-acide oxydase :	
+ DL-alanine + catalase .....	232
+ DL-alanine + catalase + INH (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	233
$\mu\text{l O}_2$ consommés (en soixante minutes).	
4. D-amino-acide oxydase :	
+ DL-alanine + catalase .....	278
+ DL-alanine + catalase + INH (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	270
+ DL-alanine + catalase + streptomycine (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	280
+ DL-alanine + catalase + PAS (2 500 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	235

Composition de base des fioles : solution de D-amino-acide oxydase (correspondant à 50 mg environ de poudre acétonique) ; tampon pyrophosphate + HCl 0,05 M, pH 8,3 ; FAD 0,0001 M. Volume total : 2 ml. Cupule centrale : 0,2 ml de KOH à 20 p. 100 + papier. DL-alanine (100  $\mu\text{M}$ ) ajoutée au temps 0.

Nos études antérieures ont montré, d'autre part, que l'INH non seulement empêche la formation de la catalase et de la peroxydase dans les bacilles tuberculeux, mais inhibe directement et d'une façon non compétitive l'activité de ces enzymes, employés à l'état purifié.

Ainsi, contrairement à ces enzymes héminiques, les L- et D-amino-acide oxydases, dont l'activité implique la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et dont les coenzymes sont, respectivement, la flavine mononucléotide et la flavine adénine dinucléotide (FAD), ne sont pas inhibées par l'INH.

#### CONCLUSION.

Pour une même souche de Mycobactéries, tout en inhibant totalement ou en grande partie, la formation de la catalase et de la peroxydase (enzymes héminiques détruisant l'eau oxygénée), l'INH (hydrazide de l'acide iso-nicotinique) n'empêche pas la

formation du système amino-acide oxydasique, qui implique la production de l'eau oxygénée.

En contact direct, l'INH, la streptomycine ou la D-cycloserine n'inhibent pas l'activité des L- ou D-amino-acide oxydases.

### SUMMARY

#### METABOLISM OF INH-SENSITIVE AND INH-RESISTANT MYCOBACTERIA. AMINO-ACID OXIDASE ACTIVITY (PRODUCTION OF $H_2O_2$ ).

Although INH totally or almost totally inhibits catalase-peroxidase formation (an haeminic enzyme which destroys  $H_2O_2$ ), it does not prevent amino-acid-oxidase formation (an enzyme which produces  $H_2O_2$ ).

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.
- [2] ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). a) *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 586 ; b) *Ibid.*, 1956, **91**, 767 ; c) *Ibid.*, 1957 **93**, 281.
- [3] BARRY (V. C.), CONALTY (M. L.), DENNENY (J. M.) et WINDER (F.). *Am. Rev. Tub.*, 1957, **75**, 476.
- [4] KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). *Biochem. J.*, 1945, **39**, 293.
- [5] NEGELEIN (E.) et BRÖMEL (H.). *Biochem. Z.*, 1939, **300**, 225.
- [6] AUBEL (E.), ROSENBERG (A. J.) et DE CHEZELLES (N.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 1152.
- [7] ROSENBERG (A. J.) et NISMAN (B.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1949, **3**, 348.
- [8] ANDREJEW (A.). a) *Thèse Doct. Sci. Univ.*, Paris, 1954 ; b) *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1091.
- [9] BURTON (K.), in COLOWICK (S. P.) et KAPLAN (N. O.). *Methods in Enzymology*, 1955, **2**, 199. Acad. Press Inc. Publ., New York.
- [10] POTTER (V. R.), in UMBREIT (W. W.), BURRIS (R. H.) et STAUFFER (J. F.). *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publ. Co., Minn., 1951.
- [11] BLANCHARD (M.), GREEN (D. E.), NOCITO (V.) et RATNER (S.). *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 583.

# RECHERCHES SUR L'ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE DES ENTÉROCOQUES AUX ANTIBIOTIQUES USUELS DE 1950 A 1956

## L'ACTION COMPARÉE *IN VITRO* DE L'ÉRYTHROMYCINE, DE LA MAGNAMYCINE, DE LA SPIRAMYCINE, DE LA NOVOBIOCINE DE L'OLÉANDOMYCINE ET DE LA VANCOMYCINE,

DEUXIÈME PARTIE.

par A. LUTZ et M<sup>lle</sup> M. J. HOFFERER (\*).

(Laboratoire Départemental de Bactériologie de Strasbourg  
{Directeur : D<sup>r</sup> A. LUTZ})

La première partie de ce travail a montré :

1° Qu'en 1957 les antibiotiques pouvaient être rangés dans l'ordre décroissant suivant d'après le plus grand nombre de souches sensibles : chloramphénicol, tétracyclines, streptomycine, pénicilline.

Un assez grand nombre des souches résistantes à ces 5 antibiotiques sont encore sensibles à l'érythromycine, à la spiramycine, à la framycétine, à la néomycine et à la bacitracine.

TABEAU I.

	!	Actinomyces producteur	!
Erythromycine	!	Streptomyces erythreus	!
Spiramycine	!	Streptomyces ambofaciens	!
Magnamycine	!	Streptomyces halstedii	!
Novobiocine	!	Streptomyces niveus	!
( streptonivicine	!	(Streptomyces sphaeroides)	!
( albamycine	!		!
( cathomycine	!		!
( cardelmycine	!		!
Oléandomycine	!	Streptomyces antibioticus	!
Vancomycine (**)	!	Streptomyces orientalis	!

(\*\*) Nous remercions les laboratoires Lilly pour la vancomycine qu'ils ont bien voulu mettre à notre disposition.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 juillet 1957.



TABLEAU II.

SOUCHES	PROVENANCE	PENICILLINE (U.)	CHLORAMPHENICOL ( $\mu$ g.)	TETRACYCLINE ( $\mu$ g.)	ERYTHROMYCINE ( $\mu$ g.)	SPIRAMYCINE ( $\mu$ g.)	MAGNAMYCINE ( $\mu$ g.)	NOVOBIOCTAM ( $\mu$ g.)	OLEANDOMY- CINE ( $\mu$ g.)	VANCOMYCINE ( $\mu$ g.)
SOUCHES SENSIBLES AUX TETRACYCLINES										
5955	urines	2	10	1	0,05	0,5	0,2	10	0,5	1
5919	plaie	2	50	1	>50	>50	20	20	>50	0,5
3035	selles	5	50	1	0,1	0,5	0,2	10	0,5	0,5
11946	sang	1	5	0,1	≤0,1	0,5	1	1	0,2	
4724	pus d'otite	2	50	4	>50	>50	>50	10	>50	2
5466	crachats	2	50	2	>50	>50	0,5	10	>50	1
5239	péritonite	5	50	5	>50	>50	2	10	>50	1
SOUCHES RESISTANTES AUX TETRACYCLINES										
14375	abcès appendic.	1	≤0,5		≤0,05	0,2	0,1	5	0,05	
14917	urines	2	3		0,05	1	1	15	1	
14601	urines	3	3		0,05	0,3	0,5	15	0,75	
6602	selles	2	5		0,1	0,2	0,5	10	1	
12045	sang	2	2		0,2	0,5	0,5	5	0,5	
14325	otorrhée	2	2		0,2	1	0,1	1	2	
14426	urines	3	5		0,2	0,5	0,5	20	0,5	
14723	pus péritonéal	2	5		0,2	0,5	1	10	1	
15169	urines	2	5		0,05	2	0,5	20	0,2	
15198	contenu vaginal	2	5		0,05	0,5	0,2	10	0,5	
14958	urines	2	3		0,2	0,2	1	15	0,5	
88	crachats	1	5		≤0,1	0,5	0,5	20	0,75	1
99	sang	2	5		0,2	2	1	1	0,5	1
2046	plaie	5	5		0,2	0,2	0,2	10	0,5	1
850	selles	2	5		0,1	1	0,5	10	0,75	1
4304	acromatose	2	5		0,05	0,5	0,5	20	0,5	1
5010	urines (pyélique)	5	5	50	0,2	1	0,5	20	1	1
5677	urines	5	5	15	>50	>50	1	20	>50	2
5684	urines	2	5	100	0,05	0,5	0,2	20	0,5	1

TABLEAU II.

SOURCES	PROVENANCE	PENICILLINE (U.I.)	CHLORAM- PHENICOL (μg)	TETRACYCLINE (μg)	ERYTHROMY- CINE (μg)	SPIRAMYCINE (μg)	MAGNAMYCINE (μg)	NETILMICINE (μg)	GLENCAMY- CINE (μg)	VANCO- MYCINE (μg)
SOURCES RESISTANTES AUX TETRACYCLINES ET AU CHLORAMPHENICOL										
456	gorge	5	20	100	2	>50	5	10	>50	2
1368	crachats	2	40	R	0,2	1	0,5	10	1	2
1045	urines	5	40	R	0,2	2	0,5	20	0,5	2
15158	osées	2	50	R	0,05	2	0,5	15	0,5	
14502	sang	3	50	R	>50	>50	2	20	>100	
14313	osées + 15	3	50	R	200	>100	5	20	>50	
16489	urines cystite	5	50	R	0,5	0,5	0,5	20	0,5	2
1	osées	5	50	R	5	>20	>10	20	>50	2
49	plac	5	50	R	>20	>20	5	10	>50	
591	urines	5	50	R	0,5	0,2	0,5	25	0,5	2
268	seies	5	50	R	>50	>50	2	15	>50	2
138	crachats	3	50	R	>50	>50	2	20	50	4
1954	ostée	4	50	R	≤ 0,1	0,2	≤ 0,1	20	0,5	1
2461	stomatite	2	50	R	>50	>50	0,25	10	>50	1
745	seies	2	50	R	>50	>50	0,5	10	>50	2
218	crachats	2	20	R	>50	>50	0,2	20	>50	1
238	gorge (gonorrh)	4	50	R	0,2	0,2	0,2	50	0,5	2
2544	urines	2	20	R	>50	>50	0,5	15	>50	1
4460	urines	2	50	50	>50	>50	20	15	>50	2
4462	eczéma	1,5	50	50	>50	>50	5	20	>50	2
14815	urines	2	>50	R	≤ 0,05	0,75	0,5	20	1	
14755	urines	3	>50	R	>50	>100	>100	50	>100	
446	seies	2	>100	R	>100	>50	>50	20	>50	2
137	gorge	5	100	R	>50	>50	4	10	>50	2
1601	urines	1,5	100	R	>50	>50	1	10	>50	1,5
34	gorge	5	>50	R	>20	>20	50	10	>50	2
483	urines	5	>50	R	0,1	0,5	0,5	20	0,5	1
5364	urines	3	50	20	>50	>50	>50	10	>50	

2° L'augmentation croissante de souches polymédicamenteuses.

Ces données nous amènent à étudier dans la deuxième partie de ce travail l'action bactériostatique et bactéricide d'antibiotiques plus récents comparée à celle des antibiotiques usuels.

Voici les antibiotiques dont nous envisagerons l'action comparativement (tableau I).

*A. Bactériostase.* — Cette étude comparative porte sur 54 souches appartenant à des antibiotypes différents. Le tableau II résume l'ensemble des concentrations minimales inhibitrices obtenues.

Ce tableau met en évidence les faits suivants :

a) Une résistance croisée systématique entre l'érythromycine, la spiramycine et l'oléandomycine. Ces faits diffèrent de ceux que nous [25] avons observés pour les staphylocoques résistants à l'érythromycine et dont certaines souches sont encore sensibles à l'oléandomycine.

b) Il n'y a pas de résistance croisée systématique entre la magnamycine et les trois antibiotiques précités. Sur 24 souches résistantes à l'érythromycine, il n'y en a que 12 qui résistent à la magnamycine.

c) Les C. M. I. les plus faibles trouvées sont celles obtenues avec l'érythromycine, à savoir : 0,05 µg/ml. Pour les souches sensibles, les taux inhibiteurs de spiramycine, de magnamycine et l'oléandomycine sont fréquemment du même ordre.

d) Les taux de pénicilline nécessaires pour la bactériostase de ces souches à antibiotypes différents sont compris dans un intervalle très restreint : 1 à 5 U.

e) Les taux bactériostatiques de vancomycine sont assez constants et le plus souvent de 1 et 2 µg/ml.

f) Les C. M. I. de novobiocine peuvent être très faibles : 3 de nos souches sont inhibées par 1 µg/ml et 2 par 5 µg/ml. Mais la majorité des souches ne sont sensibles qu'à 10 à 20 µg/ml.

g) Pour les souches étudiées, un fort accroissement des taux inhibiteurs de chloramphénicol, de tétracycline ou d'érythromycine n'entraîne pas une augmentation parallèle des C. M. I. de pénicilline et de vancomycine.

Notons à ce sujet que sur 17 souches sensibles seulement au chloramphénicol 1 seule résiste à l'érythromycine, à la spiramycine et à l'oléandomycine, mais sur 28 souches résistantes aux 6 antibiotiques usuels, 19 résistent aux 3 antibiotiques. Pour 6 souches sensibles aux tétracyclines et résistantes à la pénicilline, à la streptomycine et au chloramphénicol, 4 résistent à la spiramycine et à l'oléandomycine.

h) Les C. M. I. d'oléandomycine des 29 souches sensibles sont comprises pour la plupart entre 0,2 et 1 µg/ml, taux facilement atteints dans le sang comme l'ont montré Bernstein et Piller [26].



Ces auteurs ont affirmé que cet antibiotique était plus actif sur les infections à entérocoques que la pénicilline, l'érythromycine et la carbomycine ou magnamycine, mais qu'il était cependant moins efficace que la terramycine.

**B. Action bactéricide.** — On sait que pour ces germes l'étude du pouvoir bactériostatique est très insuffisante. La recherche du pouvoir bactéricide des antibiotiques revêt ici une importance capitale. En effet, la sensibilité par la méthode des disques à diverses concentrations (disques Difco) nous a montré combien la population bactérienne des diverses souches d'entérocoques était hétérogène et la variabilité du nombre des survivants, ce qui explique en clinique une sélection des germes résistants au cours des diverses thérapeutiques.

Après des contacts de dix-huit à quatre-vingt-douze heures en milieu liquide, nous avons repiqué sur gélose au sang 0,05 ml des tubes où il n'y avait pas de croissance apparente. Après quarante-huit heures de séjour à l'étuve à 37° nous avons examiné les milieux.

Voici les résultats pour 20 souches récemment isolées de produits pathologiques (tableau III).

Ce tableau montre que :

a) Il n'y a pas un très grand écart entre les taux bactériostatiques et bactéricides de pénicilline, d'où l'intérêt non négligeable de cet antibiotique.

Signalons que Eagle [27, 28] et Jawetz [1] et leurs collaborateurs ont observé un phénomène de zone. On peut observer une bactéricidie totale pour une certaine concentration de pénicilline, alors que pour des taux plus faibles et plus élevés cet antibiotique permet la survie de nombreux entérocoques. Ceci amène à penser que la dose stérilisante de ces germes est un hasard et qu'elle est comprise dans une zone étroite. A côté des succès enregistrés par la pénicillinothérapie à forte dose dans des cas de septicémie avec ou sans endocardite, des échecs ou des rechutes ont amené plusieurs auteurs à étudier des associations diverses. Grün [29] arriva à une légère amélioration de la pénicilline en lui associant un sel de la 4-amino-méthylbenzolsulfonamide avec la sulfathiourée. Harvier [30], Jawetz [1, 31], Gunnison [32], Robbins et Tompsett [33], Cates [34], Martin [35], Siguier [36], Morin [37], Pilkington [38] et leurs collaborateurs, etc., ont montré l'intérêt d'associer la streptomycine à la pénicilline et la plupart d'entre eux ont traité avec succès des endocardites à entérocoques à l'aide de cette association. Dans un cas d'endocardite à entérocoques, guérie par cette association, nous avons observé qu'une souche poussant encore en présence de 20 µg de streptomycine et nécessitant 1 U/ml de pénicilline comme C. M. I., était inhibée par

TABLEAU III.

		CONCENTRATIONS EN $\mu\text{g/ml}$ . (en U./ml. pour la Pénicilline)												TEMPS DE CONTACT EN HEURES
		PENICILLINE	STREPTOMYCINE	CHLORAMPHENICOL	AMICACINE	TERAMYCINE	TETRACYCLINE	ERYTHROMYCINE	SPIRAMYCINE	MAGNATHYNE	NOVOBIOCINE	OLEANDRYCINE	VANCOMYCINE	
F.3	stase	2	100	5	0,2	0,25	0,2	0,2	1					18
	cidie	10	200	750	25	20	20	10	10					
F.6	stase	2,5	7100	4	0,25	0,4	0,2	1	1					92
	cidie	10		10	10	5	1	2	2					
7 (faecalis)	stase	2	7100	4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2				72
	cidie	10		10	10	5	1	1	1	2				
1 (zymogenes)	stase	72	30	4	0,1	0,15	0,2	0,1	2					64
	cidie		740	720	710	710	710	72	75					
2 (liquefaciens)	stase	5		5	6	10	20	1	1					72
	cidie	10		10	750	20	50	2	10					
4 (faecalis)	stase	5		4	20	20	20	1	1					18
	cidie	10		750	740	740	740	75	710					
5 (faecalis)	stase	5	50	6	0,4	0,4	0,4	0,4	1					18
	cidie	10	100	750	720	720	720	75	710					
2461	2			50				750	750	0,25	10		1	48
	2			750						750	750		1	
745	2		50					750	750	0,5	10		2	48
	5		7100					750	750	750	20	50	50	
2046	stase	5		5				0,2	0,2	0,2	10	0,5	1	48
	cidie	5		7100				0,2	0,5	2	20	2	2	
1601	stase	1,5		100				750	750	1	10		115	48
	cidie	5		7100						750	40		720	
5919	stase	2		50			1	750	750	20	20		0,5	48
	cidie	5		7100			50			750	750		1	
3035	stase	5		50			1	0,1	0,5	0,2	10	0,5	0,5	48
	cidie	10		7100			100	5	750	10	750	750	75	
4460	stase	2		50			50				15		2	48
	cidie	2		7100			100				50		2	
4304	stase	2		5			50	0,05	0,5	0,5	20	0,5	1	48
	cidie	5		7100			100	50	750	50	7100	750	3	
591	stase	5						0,5	0,2	0,5	25	0,5	2	48
	cidie	710						10	750	750	750	750	750	
268	stase	5								2	15		2	48
	cidie	710								750	750	750	2	
4462	stase	1		50			50				20		2	48
	cidie	5		7100			100				50		2	
238	stase	4		50				0,2	0,2	0,2	50	0,5	2	48
	cidie	5		7100				5	10	10	7100	750	6	
2544	stase	2		20							15		1	48
	cidie	2		7100							7100		2	

l'association : streptomycine, 1  $\mu\text{g}$  + 0,04 U de pénicilline, ce qui montre une très forte synergie avec potentialisation. Gould et collaborateurs ont obtenu de bons résultats avec cette association dans une infection urinaire [39].

b) Dans la majorité des cas le chloramphénicol et les tétra-

cyclines sont peu bactéricides et les taux nécessaires sont le plus souvent impossibles à atteindre dans le sang. Friedberg [40] a fait part, en 1950, des rechutes qu'il a observées après cinq à huit semaines de traitement avec une dose quotidienne de 3 à 4 g d'auréomycine et dès la première semaine qui suit l'arrêt du traitement. Récemment, Hell [41] a abouti à la conclusion que les tétracyclines et le chloramphénicol utilisés seuls ne devaient pas être utilisés pour le traitement des endocardites. Mais Pilkington et ses collaborateurs [38] ont observé dans 17 cas sur 18 un effet synergique entre le chloramphénicol et la streptomycine. Dans leur étude sur les infections du tractus urinaire, Gould et collaborateurs [39] ont noté une action nette sur les entérocoques en utilisant cette association. Sur 72 cas d'infections urinaires à entérocoques, traités uniquement par le chloramphénicol Raabe et Albrecht [4] ont obtenu une guérison bactériologique (urine stérile) dans 59 cas. Sept fois ces auteurs ont noté une nette amélioration avec présence de rares entérocoques dans les urines. Les 6 échecs correspondaient aux malades chez qui les germes isolés des urines n'étaient que moyennement sensibles à cet antibiotique.

c) Le rapport  $\frac{Q_{\text{cidie}}}{Q_{\text{stase}}}$  est très variable pour les souches sen-

sibles à l'érythromycine et le plus souvent les taux bactéricides ne sont pas atteints dans le sang. Waisbren [42] rapporte cependant l'intérêt de la combinaison érythromycine-chlortétracycline-streptomycine dans le traitement des endocardites à entérocoques où la combinaison pénicilline-streptomycine a échoué. L'action de cette triple association est attribuée à une potentialisation des actions bactériostatiques et un effet additif du pouvoir bactéricide des trois antibiotiques. Nous avons noté dans un cas d'infection du tractus urinaire à entérocoques une nette synergie en associant la pénicilline et l'érythromycine. La souche nécessitait 3 U de pénicilline/cm<sup>3</sup> et 1,2 µg/ml d'érythromycine pour être inhibée. Le même résultat était obtenu par l'association suivante : pénicilline, 0,04 U et érythromycine, 0,5 µg/ml. Notons d'ailleurs que les taux d'excrétion urinaire d'érythromycine sont très élevés, de huit à seize fois supérieurs à la concentration sanguine et davantage (jusqu'à mille à deux mille fois plus), comme l'ont montré Tunevall et Hedenius [43] qui atteignent fréquemment les taux nécessaires à la bactéricidie des germes. De bons résultats dans le traitement des infections à entérocoques du tractus urinaire ont été obtenus par Pulaski [44] et Mouratoff [45] et leurs collaborateurs. Ce dernier a obtenu, sur 9 infections génito-urinaires, 6 succès cliniques et bactériologiques, 2 améliorations cliniques et 1 seul échec. Par ailleurs, Cathala et ses collabora-

teurs [46] ont rapporté des gastro-entérites graves à entérocoques, secondaires à l'antibiothérapie et traitées efficacement par l'érythromycine. Dans les cholécystites à entérocoques cet antibiotique s'avère également particulièrement intéressant du fait de ses concentrations élevées dans la bile.

d) L'action bactéricide de la spiramycine est variable selon les souches, mais souvent faible. Signalons que Darbon et Grosnier [47] ont rapporté la guérison par cet antibiotique d'une endo-

TABLEAU IV.

SOUCHE N°	TETRACYCLINE $\mu\text{g/ml.}$	OLEANDOMYCINE $\mu\text{g/ml.}$	SIRIAMYCINE en $\mu\text{g.}$	
			stase	cidie
5955	1	0,5	0,2	8
5919	1	>50	0,5	>10
3035	1	0,5	0,2	>20
4724	4	>50	2	20
5466	2	>50	1	10
5239	5	>50	20	50
850	R	0,75	2	10
4304	R	0,5	2	>50
5010	50	1	1	
5677	15	>50	2	
5684	100	0,5	1	4
456	100	>50	>50	
1368	R	1	1	5
4460	50	>50	>20	
4462	>50	>50	10	>20
1601	R	>50	5	>50
5364	20	>50	25	>50

cardite à entérocoques confirmée par plusieurs hémocultures, chez un homme de 27 ans, précédemment porteur d'une insuffisance aortique. Ravina et Pestel [48] ont traité avec succès avec cet antibiotique administré à la dose quotidienne de 3 g puis de 4 g une endocardite à entérocoques survenue chez une femme de 42 ans, ancienne mitrale. L'antibiotique fut très bien toléré (dose totale : 125 g).

e) Le pouvoir bactéricide de la magnamycine sur l'entérocoque est faible. Signalons cependant que Trafton et collaborateurs [49] ont obtenu de bons résultats dans 8 cas d'infections des voies urinaires avec des concentrations relativement faibles. De même Finn et Kane [50] ont utilisé la magnamycine dans 8 cas d'infections des voies urinaires à entérocoques. Les malades guérirent rapidement, la stérilité bactériologique des urines ayant



été obtenue en trois jours. Par ailleurs, Tanner et ses collaborateurs [51] avaient insisté en 1952 sur l'action particulièrement prononcée de la magnamycine sur les diverses souches d'entérocoques.

f) Les taux bactéricides d'oléandomycine sont souvent plus de cent fois plus élevés que les taux bactériostatiques. Cependant, Shildlovsky et collaborateurs [52] ont montré récemment que l'oléandomycine à la dose de 2 g par jour réduit considérablement le nombre de germes Gram positifs de l'intestin et en particulier les entérocoques. Cet auteur préconise parmi les thérapeutiques utilisables l'association oléandomycine-néomycine pour l'antiseptie intestinale. Nous avons recherché l'action bactériostatique et bactéricide d'une association connue sous le nom de « sigmamycine », composée de tétracycline (2 parties) et d'oléandomycine (1 partie). Nos résultats sont rapportés dans le tableau IV.

Ce tableau montre pour ces deux antibiotiques une forte synergie avec potentialisation pour la bactériostase, mais à part deux cas la bactéricidie de cette association reste relativement faible.

g) En ce qui concerne la novobiocine, les taux bactéricides ne sont souvent que de deux à trois fois plus élevés que les taux bactériostatiques. Mais ces derniers, quoique atteints dans le sang, sont fréquemment de 10 à 20  $\mu\text{g/ml}$ . Signalons que dans 6 infections du tractus urinaire à entérocoques, Trafton et Lind [53] ont obtenu avec la novobiocine 2 guérisons dans le cas de 2 souches très sensibles (0,78 et 1,56  $\mu\text{g/ml}$ ) et 4 améliorations cliniques avec diminution de la pyurie pour des souches moins sensibles (25, 12,5, 12,5, 12,5, 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Notons à ce sujet que ces auteurs ont trouvé dans 4 cas des concentrations urinaires et sanguines du même ordre de grandeur et n'ont pas dépassé 50  $\mu\text{g/ml}$  d'urine. Ceci montre bien la nécessité de concentrations bactéricides.

Enfin, Dimmling et Knothe [54] signalent de bons résultats dans un cas d'infection des voies biliaires, un empyème à entérocoques, staphylocoque et colibacille, et dans des cystites à entérocoques. Cet auteur a trouvé 78,8 p. 100 des souches étudiées (81) sensibles à des concentrations comprises entre 0,78 et 6,25  $\mu\text{g/ml}$ .

h) L'étude de l'action de la vancomycine dans les conditions de nos expériences nous a montré que dans 7 cas sur 13 les concentrations bactéricides et bactériostatiques sont égales ou voisines. Dans 6 cas la bactéricidie totale nécessite de fortes concentrations de cet antibiotique, ce qui met bien en évidence l'hétérogénéité des souches d'entérocoques. Geraci et ses colla-

borateurs [55] ont rapporté son action sur la flore fécale ; ils ont noté une forte diminution ou une suppression des entérocoques.

Voici ce que nous avons observé en associant pour deux souches la pénicilline et la vancomycine (tableau V).

Il y a effet additif dans la bactériostase, mais non dans la bactéricidie.

TABLEAU V.

	SOUCHE N°1			SOUCHE N°2		
	PENICILLINE	VANCOMYCINE	PENICILLINE + VANCOMYCINE	PENICILLINE	VANCOMYCINE	PENICILLINE + VANCOMYCINE
STASE	3	1,5	0,8+0,8	3	2	0,8+0,8
CIDIE	6	>8	>5+5	8	>8	>5+5

## CONCLUSION.

Il résulte de cette étude, et dans nos conditions expérimentales, les faits suivants :

a) Un net accroissement du pourcentage de résistance à chacun des antibiotiques usuels envisagé séparément. Cependant, d'après les diverses statistiques, le pourcentage le plus élevé de souches sensibles correspond toujours au chloramphénicol. Les fortes concentrations de pénicilline indispensables pour la bactériostase des souches contrastent avec celles nécessaires pour les streptocoques du groupe A.

b) Une relative fréquence (31,8 p. 100) des souches isolées en 1957, résistantes aux six antibiotiques usuels, à savoir : pénicilline, streptomycine, chloramphénicol et tétracyclines.

Par ailleurs, nous avons trouvé, en 1957, 17,6 p. 100 de souches qui résistent à ces 6 antibiotiques, à l'érythromycine et à la spiramycine.

c) Il y a une résistance croisée systématique entre l'érythromycine, la spiramycine et l'oléandomycine. Sur 24 souches qui résistent à cette triade d'antibiotiques, 12 sont encore sensibles à la magnamycine. Parmi les souches que nous avons testées, peu sont très sensibles à la novobiocine. Les C. M. I. de vancomycine sont assez constantes et en général de l'ordre de 1 à 2 µg/ml.

d) Pour la plupart des souches les taux nécessaires pour obtenir une bactéricidie totale sont souvent élevés. L'intervalle entre la bactériostase et la bactéricidie des souches est le moins variable et souvent le plus faible pour la pénicilline et à un moindre degré pour la vancomycine.

e) L'intérêt et les possibilités des antibiotiques utilisés seuls

tels que le chloramphénicol, l'érythromycine, la magnamycine et l'élargissement du champ d'action, grâce aux antibiotiques plus récents, dans les infections urinaires, etc., mais l'insuffisance de chacun de ces antibiotiques dans le traitement des formes septicémiques telles que des endocardites. Dans ces cas, des associations présentant de fortes potentialisations telles que pénicilline-streptomycine, ou érythromycine-chlorotétracycline-streptomycine, ont permis à de nombreux auteurs d'obtenir des succès thérapeutiques. Mais il ne faut pas perdre de vue que les doses massives de pénicilline nécessaires, même dans ces associations, peuvent provoquer des réactions toxiques ou des phénomènes de sensibilisation.

Du point de vue de la thérapeutique locale, et en particulier dans la préparation pré-opératoire pour la chirurgie intestinale, la framycétine et la néomycine seules ou associées à d'autres antibiotiques sont appelées à rendre de grands services.

Cette étude met enfin en évidence :

1° La nécessité d'une liaison étroite entre le laboratoire et la clinique afin de mettre au point une antibiothérapie aussi adéquate que possible dans des infections qui restent souvent difficiles à traiter, exposant à de nombreuses rechutes.

2° L'intérêt d'une thérapeutique à plus fort pouvoir bactéricide.

## SUMMARY

### STUDIES ON THE EVOLUTION OF RESISTANCE OF ENTEROCOCCUS TO USUAL ANTIBIOTICS FROM 1950 TO 1956.

*In vitro* COMPARATIVE ACTIVITY OF MAGNAMYCIN, SPIRAMYCIN, NOVOBIOCIN, OLEANDOMYCIN AND VANCOMYCIN.

In the authors' experimental conditions, the following data have been obtained.

a) A marked increase of the percentage of resistance to each usual antibiotic utilized alone. However, all the statistics show that the greatest proportion of strains remain sensitive to chloramphenicol. The high concentrations of penicillin required for bacteriostasis contrast with the concentrations active on group A streptococci.

b) A relative frequency (31,8 %) of the strains isolated in 1957, resisting to the six usual antibiotics : penicillin, streptomycin, chloramphenicol and tetracyclins.

Besides, the authors found in 1957, 17,6 % of the strains resisting to these six antibiotics and to erythromycin and spiramycin.

c) There exists a crossed resistance between erythromycin, spiramycin and oleandomycin. Out of 24 strains which are

resistant to these three antibiotics, 12 remain sensitive to magnamycin. Among the strains studied, very few are very sensitive to novobiocin. The minimal inhibitory concentration of vancomycin is rather constant and in general of about 1 to 2 µg/ml.

d) With most of these strains, the levels required for bactericidy are often high. It is for penicillin and to a lesser degree for vancomycin that the difference between the bacteriostatic and the bactericidal concentration is the less variable.

e) The observations prove the interest and the possibilities of antibiotics such as chloramphenicol, erythromycin and magnamycin used alone. They also show the possibility of treatment of urinary diseases by the more recent antibiotics. But all these antibiotics are deprived of any activity in the treatment of septicaemic diseases, such as endocarditis. In these cases, some very synergistic associations such as penicillin-streptomycin, or erythromycin-chloramphenicol-streptomycin, have sometimes allowed a therapeutical success. But the massive doses of penicillin which are required in these associations may provoke toxic reactions and sensibilisation phenomena.

As for local treatment and particularly pre-operative treatment in intestinal surgery, framycetin and neomycin alone or associated with other antibiotics may be very useful.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] JAWETZ (E.) et GUNNISON (J. B.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **35**, 488.
- [2] SECRETAN (M.). *Schweiz. med. Wschr.* : a) 1952, **82**, 345 ; b) 1952, **82**, 153.
- [3] GARROD (L. P.), SHOOTER (R. A.) et CURWEN (M. P.). *Brit. med. J.*, 1954, 1003.
- [4] RAABE (S.) et ALBRECHT (TH.). *Dtsch. med. Wschr.*, 1955, **80**, 1730.
- [5] AUJALEU (E.). *Paris méd.*, 23 juin 1934.
- [6] RABL (R.) et SEELEMAN (M.). *Z. Hyg.*, 1951, **132**, 394.
- [7] ANDINA (F.) et ALLEMANN (O.). *Therap. Umsch.*, 1950, 7.
- [8] GERBEAUX (CL.). *Les antibiotiques et les maladies de l'enfance*, Paris, 1952, 193.
- [9] RANTZ (L. A.) et RANTZ (H. H.). *Arch. int. Med.*, 1956, **97**, 694.
- [10] LINZENMEIER (G.). *Die Medizinische*, 1957, 1.
- [11] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **88**, 527.
- [12] FAIRBROTHER (R. W.), MARTYN (G.) et PARKER (L.). *Lancet*, 1951, **261**, 516.
- [13] GROSIDIER (J.) et GILLE (P.). *Ann. Chirurgie, Sem. Hôp.*, 1956, **32**, n° 7.
- [14] ENJALBERT (M<sup>me</sup> L.), MONNIER (J.), POUILHES (J.), SARRAZIN (R.) et LARENZ (L.). *Soc. Chir. Toulouse*, séance du 30 janvier 1957.
- [15] SHILDLOVSKY (B.) et PRIGOT (A.). *Antib. Annual*, 1956-1957, 736.
- [16] PRIGOT (A.), SHILDLOVSKY (B.), TURELL (R.) et MARMELL (M.). *Antib. Annual*, 1954-1955, 451.



- [17] LUTZ (A.) et TROUSSEL (M<sup>me</sup> A.). *Strasbourg médical*, septembre 1951.
- [18] LUTZ (A.) et DOQC (M<sup>lle</sup> J.). *Strasbourg médical*, 1957, **7**, 473.
- [19] BORNSTEIN (S.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 383.
- [20] FINLAND (M.), WILCOX (C.) et FRANK (P.). *Am. J. clin. Path.*, 1950, **20**, 208.
- [21] KOCH (M.). *Antib. Chem.*, 1953, **3**, 1081.
- [22] ANDRIEU (G.), ENJALBERT (L.) et LAPCHINE (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 555.
- [23] DOQC (J.). *Thèse de Doctorat Pharmacie* (Strasbourg), 1956.
- [24] SWANTON (E. M.) et LIND (M. E.). *Antib. Annual*, 1956-1957, 191.
- [25] LUTZ (A.), GROOTEN (O.) et HOFFERER (M. J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 778.
- [26] BERNSTEIN (A.) et PILLER (M.). *Schweiz. med. Wschr.*, 1956, 1247.
- [27] EAGLE (H.). *Science*, 1948, **107**, 44.
- [28] EAGLE (H.) et MUSSELMAN (A. D.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 130.
- [29] GRÜN (L. J.). *Z. Immunforsch.*, 1949, **106**, 249.
- [30] HARVIER (P.) et SARRAZIN (A.). *Paris méd.*, 1948, n° 17, 209.
- [31] JAWETZ (E.), GUNNISON (J. B.) et CALEMAN (V. R.). *Science*, 1950, **111**, 254.
- [32] GUNNISON (J. B.), JAWETZ (E.) et COLEMAN (V. R.). *J. Lab. clin. Med.*, 1950, **6**, 900.
- [33] ROBBINS (W. C.) et TOMPSETT (R.). *Am. J. Med.*, 1951, **10**, 278.
- [34] CATES (J. E.), CHRISTIE (R. V.) et GARROD (L. P.). *Brit. med. J.*, 1951, **1**, 653.
- [35] MARTIN (R.), SUREAU (B.) et CHABBERT (Y.). *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1952, n°s 32 et 33, 1192.
- [36] SIGUIER (F.), WELTI (J.-J.), LEMENAGER (A.) et CHIMÈNES (H.). *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1953, **69**, 52.
- [37] MORIN (M.), LAFON (J.), GRAVELEAU (J.), AICARDI (J.), ACAR (J.) et LAPLANE (D.). *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1953, **69**, 92.
- [38] PILKINGTON (T.), ELEK (S.) et JEWELL (P.). *J. Lab. and clin. Med.*, 1956, **47**, 562.
- [39] GOULD (J. C.), BOWIE (J. H.) et CAMERON (J. D. S.). *Lancet*, 1953, 361.
- [40] FRIEDBERG (C. K.). *J. am. med. Assoc.*, 1950, **144**, 527.
- [41] HELL (B.). *Med. Clin. North America*, 1957, 185.
- [42] WAISBREN (B. A.). *Arch. int. Med.*, 1954, **94**, 846.
- [43] TUNEVALL (G.) et HEDENIUS (P.). *Antib. Chem.*, 1954, **4**, 578.
- [44] PULASKI (E. J.) et WESOLOWSKI (S. A.). *Surg. Gynec. Obst.*, 1954, **98**, 55.
- [45] MOURATOFF (G.), BELL (M.) et BATTERMAN (R.). *Antib. Annual*, 1956-1957, 159.
- [46] CATHALA, POUPINET, JANET et NAUDOT. *Le Nourrisson*, 1954, **42**, 198.
- [47] DARBON (A.) et CROSNIER. *Presse méd.*, 1955, **63**, 681.
- [48] RAVINA (A.) et PESTEL (M.). *Congrès de Thérapeutique de Karlsruhe*, 28 août-5 septembre 1955.
- [49] TRAFTON (H. M.), LIND (H. E.) et CORREIA BRANCO (M.). *New England J. Med.*, 1953, 248.
- [50] FINN (J. J. Jr) et KANE (L. W.). *Bull. New. England Med. Center*, 1952, 113.

- [51] TANNER (F. W.), ENGLISH (A. A.), LEES (T. M.) et RONTIEN (J. B.).  
*Antib. Chem.*, 1952, 441.
- [52] SHILDLOVSKY (B.), MARMELL (M.) et PRIGOT (A.). *Antib. Annual*,  
1956-1957, 228.
- [53] TRAFTON (H. M.) et LIND (H. E.). *Antib. Annual*, 1956-1957, 420.
- [54] DIMMLING (TH.) et KNOTHE (H.). *Dtsche med. Wschr.*, 1957, **82**,  
950.
- [55] GERACI (J. E.), HEILMAN (F. R.), NICHOLS (D.), WELLMAN (W. E.) et  
ROSS (G. T.). *Antib. Annual*, 1956-1957, 90.
-

**LE ROLE DES IONS SODIUM ( $^{24}\text{Na}$ )  
AU COURS DE LA FIXATION DU BACTÉRIOPHAGE  
SUR LES BACTÉRIES**

par A. GUELIN et P. LÉPINE (\*).

*(Institut Pasteur, Service du Bactériophage  
et Service des Virus)*

Le processus de la bactériophagie, dans une culture infectée par le bactériophage, dépend pour une large part de la fixation des corpuscules-phages sur les bactéries. L'étude de cette fixation présente un intérêt d'autant plus grand que le phénomène général d'adsorption sur la surface cellulaire est fréquent en biologie et en médecine.

On sait depuis Costa Cruz (1923), et Lisbonne et Carrère (1923), que la fixation de certains bactériophages sur les bactéries n'a pas lieu en eau distillée ; la présence d'électrolytes, de chlorure de sodium par exemple, est indispensable. Ce fait a été confirmé par de nombreux auteurs.

La quantité de chlorure de sodium nécessaire pour une fixation maxima des corpuscules varie d'un phage à l'autre et semble, dans certains cas, être en rapport avec leurs dimensions : plus le bactériophage est grand, moins il lui faut d'électrolytes (Guélin, 1945 ; Guélin et Lépine, 1957). Ce fait ne surprend pas si l'on admet que des forces électrostatiques interviennent lors de l'adsorption des corpuscules-phages sur les bactéries et que toute la réaction est soumise aux lois des systèmes colloïdaux (Angerer, 1924 ; d'Hérelle, 1924 ; Puck et Tolmach, 1954 ; Beumer, Beumer-Jochmans et Dirkx, 1957). Dans le cas d'un petit bactériophage, la surface du corpuscule est démesurément grande par rapport à son volume. Est-ce l'importance de cette surface qui rend nécessaire la présence d'une quantité plus élevée d'électrolytes au cours de la fixation d'un petit bactériophage ? C'est à la phase de diffusion corpusculaire qu'interviendraient alors les ions sodium, mais leur participation au processus même de la fixation n'est pas exclue.

(\*) Manuscrit reçu le 30 juillet 1957.

Il était donc, de ce point de vue, intéressant de rechercher la présence de sodium dans le complexe phage-bactérie formé après la fixation. Nous avons effectué cette recherche, en utilisant le sodium radioactif ( $^{24}\text{NaCl}$ ).

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Nous avons utilisé les deux bactériophages coli-dysentériques S13 et C16, de 20 et 60 m $\mu$  respectivement (Lépine, 1945), et les bactéries de *Shigella paradysenteriae* Y6R, chauffées.

Afin de ne pas introduire d'électrolytes avec les filtrats bactériophagiques, on prépare ceux-ci à un titre élevé en eau peptonée à 3 p. 100 et on les dilue avec de l'eau distillée.

Les bactéries, après dix-huit heures de croissance en boîtes de Petri sur une couche de gélose à 2,5 p. 100, sont mises en suspension dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau salée à 4 p. 100 (par boîte). La suspension bactérienne est ensuite chauffée une heure à 58° C et lavée trois fois avec de l'eau distillée. Le dernier culot est repris avec peu d'eau, de façon à avoir une suspension plus concentrée (1.10<sup>10</sup> bactéries/cm<sup>3</sup> environ).

La solution de chlorure de sodium radioactif 5 M (dont l'activité est de l'ordre de 2 millicuries/cm<sup>3</sup>) est préparée au moment de l'expérience, six heures après l'extraction du radioélément de la pile.

On utilise 0,15 cm<sup>3</sup> de solution de  $^{24}\text{NaCl}$  5 M pour 10 cm<sup>3</sup> d'eau dans le cas du grand bactériophage C16, et 3 cm<sup>3</sup>/10 cm<sup>3</sup> dans celui du petit phage S13. Les bactéries sont introduites dans ces deux solutions à raison de 3.10<sup>9</sup> bactéries/cm<sup>3</sup>. On les maintient en contact avec le sel pendant trente minutes à 58° C. Les deux suspensions bactériennes sont ensuite divisées en deux parts de 5 cm<sup>3</sup> chacune. Dans l'une d'elles on introduit l'un des bactériophages; l'autre ne reçoit pas de phage et sert de témoin. La concentration des phages est de 300 000 corpuscules/cm<sup>3</sup>, et on laisse la fixation s'effectuer pendant une heure à 37° C. Les bactériophages sont alors titrés. La fixation est de 99 p. 100 pour le bactériophage C16 et de 98 p. 100 pour le phage S13.

Les quatre suspensions bactériennes (deux d'entre elles contenant, l'une le grand, l'autre le petit phage, les deux autres servant de témoins) sont ensuite lavées cinq fois pour éliminer le chlorure de sodium libre. La radioactivité des eaux surnageantes est mesurée. Les lavages sont faits dans des tubes à centrifuger cylindriques contenant 30 cm<sup>3</sup> d'eau distillée fermés par des couvercles vissés sur la partie la plus étroite des tubes. A chaque lavage, on change les tubes. Il est indispensable d'introduire une quantité d'eau de lavage suffisante pour qu'elle remonte largement dans la partie supérieure étroite du tube. Pour rejeter



cette eau après la centrifugation, on renverse le tube d'un mouvement brusque et on le maintient dans une position verticale ; la partie inférieure du tube est épongée avec du papier filtre. Ces précautions permettent de conserver la plus grande partie des bactéries au cours du lavage, qui représente le moment le plus délicat de l'expérience.

Après le cinquième lavage, les quatre culots bactériens sont repris avec 5 cm<sup>3</sup> d'eau chacun. Leur opacité est comparée au néphélomètre et ramenée à une même densité par addition de quelques gouttes d'eau. Nous avons maintenant partout 2.10<sup>9</sup> bactéries/cm<sup>3</sup> environ. Chacune des quatre suspensions bactériennes est répartie dans quatre coupelles d'aluminium (1 cm<sup>3</sup> par coupelle), desséchée, et sa radioactivité est mesurée.

La moyenne de la radioactivité de chaque suspension bactérienne + bactériophage (mesurée dans les quatre coupelles) est comparée à l'activité de la suspension témoin sans bactériophage. La détermination, dans une telle suspension, de l'activité de l'eau seule, permettrait d'avoir des données plus précises sur la radioactivité du dépôt bactérien ; mais cette détermination est impossible du fait qu'après chaque centrifugation l'eau contient toujours un certain nombre de bactéries qui la rendent plus radioactive.

Les coupelles sont préparées à l'avance, à partir d'une feuille d'aluminium laminé de 0,05 mm d'épaisseur. Les rondelles d'aluminium sont découpées et moulées à l'aide de deux appareils construits par l'atelier de précision de l'Institut Pasteur. Ces derniers sont une copie de modèles conçus et utilisés par M. Bonét-Maury à l'Institut du Radium. L'emploi de coupelles en aluminium supprime le lavage de ces coupelles, car, de préparation facile et peu coûteuse, elles peuvent être jetées chaque fois.

#### RÉSULTATS.

La radioactivité des bactéries ayant fixé le bactériophage en présence de sodium radioactif n'est pas plus grande que celle des bactéries sans phage (tableau I : résultats d'une de nos quatorze expériences). Elle est à peu près égale dans les deux cas et s'explique par l'adsorption d'éléments radioactifs à la surface des cellules bactériennes. Ce fait a déjà été signalé par Bonét-Maury et Deysine (1953) dans leurs recherches avec le radiophosphore. Ces auteurs précisent que le taux d'adsorption dépend de la concentration initiale de radioélément. Ce fait est confirmé par les résultats de nos expériences, car les bactéries traitées avec 3 cm<sup>3</sup> de <sup>24</sup>NaCl 5 M sont plus radioactives que celles traitées avec une quantité vingt fois moindre.

Dans nos expériences, même avec le petit phage S13, dont la fixation nécessite beaucoup d'électrolytes, l'activité des bactéries

TABLEAU I. — Radioactivité des bactéries avec et sans bactériophage fixé.

N°	Tube	$^{24}\text{NaCl}$ 5M par 10 ml	Phage $3 \cdot 10^5$ /ml	Bactéries par ml	Radioactivité du surnageant en coups/minute	Radioactivité (en coups/minute) des quatre suspensions bactériennes distribuées en quatre coupelles chacune.				Moyenne de la radioactivité
						1 <sup>re</sup> coupelle	2 <sup>e</sup> coupelle	3 <sup>e</sup> coupelle	4 <sup>e</sup> coupelle	
1 <sup>er</sup>	Expérience	0,15 ml	$C_{16}$ -60mu	$3 \cdot 10^9$	16	19	19	20	22	20
2 <sup>er</sup>	Témoin	0,15 ml	—	$3 \cdot 10^9$	16	23	21	18	21	21
3 <sup>er</sup>	Expérience	3,0 ml	$S_{13}$ -20mu	$3 \cdot 10^9$	31	100	100	103	101	101
4 <sup>er</sup>	Témoin	3,0 ml	—	$3 \cdot 10^9$	35	111	107	107	111	109

On voit que la radioactivité des bactéries ayant fixé le bactériophage en présence de sodium radioactif n'est pas plus grande que celle des bactéries sans phage. L'eau surnageante contient toujours un certain nombre de bactéries non sédimentées au cours de la centrifugation. Ces dernières rendent l'eau plus radioactive qu'elle ne l'est en réalité.

n'est pas augmentée du fait d'avoir fixé plus d'un million de corpuscules. Le complexe phage-bactérie ne comporte pas de sodium et celui-ci ne semble donc pas participer au processus intime de la fixation. En supposant même que cette participation existe mais qu'elle ne soit pas décelable par les moyens actuels, elle serait d'un ordre extrêmement faible, qui ne correspondrait pas aux exigences élevées en électrolytes d'un bactériophage de petite taille.

Tout semble donc indiquer que les ions sodium interviennent surtout à la phase de diffusion des corpuscules, avant leur fixation sur les bactéries.

#### CONCLUSION.

L'absence d'ions sodium ( $^{24}\text{NaCl}$ ) dans le complexe phage-bactérie formé après la fixation des corpuscules sur la bactérie exclut la participation de ces ions au processus intime de la fixation.

Il est permis de supposer que l'action du sodium s'exerce principalement à la phase de diffusion corpusculaire, étant donné qu'un petit bactériophage, dont la surface par rapport au volume est considérable, nécessite une plus grande quantité d'électrolytes pour sa fixation.

#### SUMMARY

##### ROLE OF Na IONS ( $\text{Na}^{24}$ ) IN THE COURSE OF THE FIXATION OF BACTERIOPHAGE ON THE BACTERIAL CELL.

The absence of Na ions ( $\text{Na}^{24}\text{Cl}$ ) in the complexe phage-bacterium (formed after phage fixation on the bacterial wall) does not allow to think that these ions are involved in the fixation process.

The experiments suggest that Na is particularly active during the diffusion phage of the corpuscles. If there were an activity of the Na ions too slight to be demonstrated by present techniques, this activity would not agree with the high electrolytes concentrations required for the fixation of the smaller phages.

★ ★

Nous voudrions exprimer ici nos vifs remerciements à M<sup>lle</sup> Dey-sine, de l'Institut du Radium, pour les conseils et les indications donnés au cours de ce travail.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ANGERER (K.). *Arch. Hyg.*, 1924, **92**, 312.  
BEUMER (J.), BEUMER-JOCHMANS (M. P.) et DIRKX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 36.  
BONÉT-MAURY (P.) et DEYSINE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 1052.  
COSTA CRUZ (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 759.  
GUELIN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1945, **71**, 487.  
GUELIN (A.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 350.  
HÉRELLE (F. D'). *Le bactériophage et son comportement*. Masson, édit., Paris, 1926, p. 96 et 261.  
LÉPINE (P.). *Recherches médicales en France pendant la guerre (1939-1945)*. Flammarion, édit., Paris, p. 39.  
LISBONNE (M.) et CARRÈRE (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 865.  
PUCK (T. T.) et TOLMACH (L. J.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **51**, 229.
-

# RECHERCHES SUR LES BACTÉRIES LYSOGÈNES DÉFECTIVES

## II — LES TYPES PHYSIOLOGIQUES LIÉS AUX MUTATIONS DU PROPHAGE.

par François JACOB, Clarence R. FUERST (\*)  
et Elie L. WOLLMAN (\*\*).

*(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne)*

On peut démontrer que l'incapacité des souches lysogènes défectives à produire du bactériophage est la conséquence de mutations du prophage [1, 2]. Ces mutations inhibent ou altèrent l'un des processus nécessaires à la biosynthèse du phage. C'est ainsi que dans la souche P14, précédemment décrite [2], la lésion génétique du prophage paraît empêcher l'une des réactions intervenant dans la morphogénèse, c'est-à-dire l'assemblage en particules infectieuses des divers éléments phagiques synthétisés au cours de la période latente. Il y a tout lieu de penser qu'il existe, le long du génome d'un bactériophage, un grand nombre de régions qui gouvernent des fonctions nécessaires à la production de particules infectieuses. Une mutation survenant à l'un de ces loci se comporte comme une mutation létale pour le phage, mais elle peut être conservée tant que le matériel génétique du phage reste à l'état de prophage chez une souche défective.

L'isolement de nombreuses souches défectives et leur étude systématique offrent un moyen d'étudier les processus qui interviennent au cours du développement du phage. En analysant chaque souche, tant du point de vue génétique que du point de vue physiologique, on peut tenter, d'une part d'établir une corrélation entre la lésion génétique du prophage et la perturbation apportée au développement du phage, et d'autre part de préciser les différentes étapes de ce développement.

Nous nous proposons d'étudier ici les propriétés de quelques souches lysogènes défectives. Dans une première partie seront décrites les méthodes permettant d'individualiser certains aspects

(\*) Boursier du National Research Council du Canada. Adresse actuelle : Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada.

(\*\*) Manuscrit reçu le 1<sup>er</sup> septembre 1957.



du développement du phage ainsi que les résultats obtenus par l'application de ces méthodes aux diverses souches défectives. Dans une seconde partie seront précisées les modifications apportées au développement du phage par chaque type de lésion génétique.

### Matériel et technique.

SOUCHES. — Les propriétés des bactéries lysogènes *E. coli* K12( $\lambda$ ) du phage  $\lambda$  et de ses mutants ont déjà été décrites [2, 3, 4].

Les souches défectives décrites dans ce mémoire ont été isolées à partir de souches lysogènes de K12( $\lambda$ ). Les unes (P16, P17, P18, P19, P21, P22, P28, P30) proviennent de bactéries ayant survécu à de fortes doses de rayonnement ultraviolet, les autres (P32, P34) de bactéries ayant survécu à la désintégration de radiophosphore [5].

Toutes ces souches produisent peu de bactériophages. Après exposition des cultures à une dose de lumière U. V. qui induit le développement du phage dans la presque totalité des bactéries lysogènes normales, la fraction des bactéries défectives libérant du phage ne dépasse pas  $10^{-4}$  à  $10^{-7}$  (voir tableau I, colonne 1). Ces bactéries perpétuent cependant un prophage comme en témoigne leur immunité caractéristique (immunité à l'égard de  $\lambda+$  et  $\lambda c$ , sensibilité à l'égard de  $\lambda v$ ).

MILIEUX. — Les milieux utilisés pour l'étude du phage  $\lambda$  et de ses mutants ont été décrits dans des mémoires précédents [2, 4].

EXTRAITS BACTÉRIENS. — Les extraits nécessaires à l'étude de certaines réactions ont été préparés en exposant des suspensions bactériennes pendant dix minutes aux vibrations soniques produites par un appareil du type « Raytheon ».

## I. — MÉTHODES D'ÉTUDE DES SOUCHES DÉFECTIVES

Le développement du phage, chez les bactéries lysogènes normales irradiées comme chez les bactéries sensibles infectées, se termine par la production de particules infectieuses et la lyse bactérienne. Chez les bactéries défectives, au contraire, l'irradiation n'entraîne pas la formation de particules infectieuses. Si l'on veut préciser la nature de la lésion qui, dans ces souches, empêche la formation de phages, il est nécessaire de disposer de méthodes permettant de distinguer et d'étudier séparément les divers processus intervenant dans la production de phage. En appliquant ensuite ces méthodes aux souches défectives, on peut rechercher quels sont, parmi ces processus, ceux que ne peut effectuer une souche défective donnée.

Dans cette première partie, nous examinerons divers aspects

de la biosynthèse du phage qui sont accessibles à l'expérimentation. Dans chaque cas seront décrits successivement les méthodes d'étude et les résultats obtenus avec diverses souches défectives.

#### A. — LA LYSÉ BACTÉRIENNE ET L'ENDOLYSINE.

1° MÉTHODES D'ÉTUDE. — Si l'on expose des bactéries lysogènes normales à une dose optimale de lumière U. V., on constate que la croissance bactérienne se poursuit pendant quatre-vingts minutes environ. A ce moment débute la lyse qui se poursuit jusque vers la cent vingtième ou cent cinquantième minute. Les particules de phage apparaissent dans le milieu au début de la lyse et leur nombre augmente progressivement jusqu'à la fin.

Les bactéries défectives soumises à une telle irradiation se comportent de façon variable suivant la souche et l'on peut actuellement en distinguer trois types.

1° Certaines souches (type P16) se lysent comme les bactéries lysogènes normales. Après irradiation, les bactéries poursuivent leur croissance pendant quatre-vingts minutes environ, puis elles se lysent, sans libérer de phage (fig. 1, courbe 1).

2° Une autre souche (P30) présente après irradiation une croissance résiduelle identique à celle des bactéries lysogènes normales. Cependant, on n'observe pas de lyse après quatre-vingts minutes et la densité optique demeure inchangée pendant plusieurs heures (fig. 1, courbe 2).

3° Chez d'autres souches (type P22), la croissance résiduelle se poursuit au-delà de la quatre-vingtième minute. La vitesse diminue progressivement et devient nulle après cent quatre-vingts ou deux cents minutes (fig. 1, courbe 3).

L'hypothèse la plus simple pour expliquer ces différences est que les souches défectives qui se lysent après irradiation, comme les souches lysogènes normales, produisent une ou plusieurs substances dont la synthèse ferait défaut chez les souches défectives qui ne se lysent pas.

Le mécanisme de la lyse bactériophagique est encore mal connu. Depuis longtemps, on a recherché, dans les lysats bactériophagiques, la présence de substances capables de lyser des bactéries non infectées. Si de telles substances ont parfois pu être mises en évidence dans les lysats de bactéries Gram-positives [6, 7, 8], elles n'ont pu être retrouvées dans les lysats de bactéries Gram-négatives. Chez ces dernières, on a décrit des « lysines » qui exercent un effet lytique seulement sur les préparations de bactéries préalablement inactivées par des traitements divers [9, 10, 11, 12]. Le rôle de ces substances dans les processus de la lyse bactériophagique n'a jusqu'ici pu être démontré.

La différence entre bactéries Gram-positives et Gram-négatives se retrouve dans la sensibilité de ces organismes à l'égard d'autres agents lytiques. Pendant longtemps, on a cru que le lysozyme, par exemple, n'était actif que sur les bactéries Gram-positives. Récemment, le mode d'action du lysozyme a pu être précisé [13, 14, 15]. En particulier, on a pu démontrer que, dans des conditions bien définies, cet enzyme est également capable de lyser des organismes Gram-négatifs [16, 17]. Ces données nouvelles conduisent à réexaminer l'hypothèse d'une substance

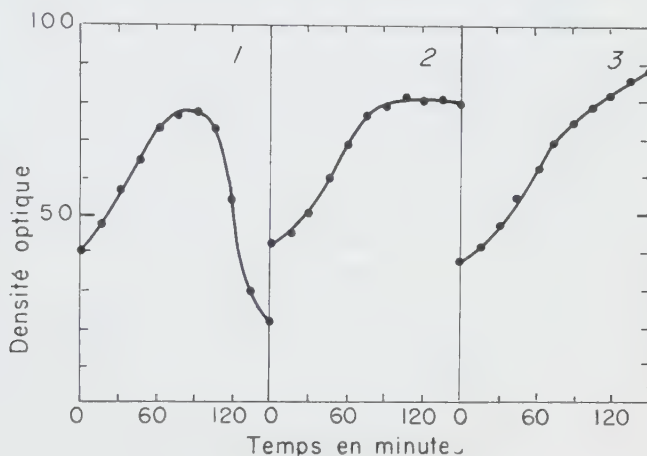


FIG. 1. — Les différents types de réactions observées après induction des bactéries déficientes. — Des suspensions de bactéries en voie de croissance sont exposées à une dose optimale de lumière U.V., qui induit le développement du prophage dans l'ensemble d'une population lysogène normale d'*E. coli* K12 (temps 0). Les suspensions sont ensuite agitées à 37°. En ordonnée, la densité optique; en abscisse, le temps en minutes. Courbe 1: souche P16; courbe 2: souche P30; courbe 3: souche P22.

lytique formée au cours du développement du phage. Si la lyse des bactéries infectées par le phage est due à la formation d'une substance agissant « du dedans », cette substance pourrait exiger des conditions de milieu analogues à celles nécessaires au lysozyme pour agir « du dehors » sur les bactéries non infectées.

En effet, des lysats obtenus par induction d'*E. coli* K12( $\lambda$ ), puis débarrassés, par centrifugation, des particules infectieuses, provoquent la lyse de suspensions bactériennes de la même espèce, préalablement traitées par le chloroforme ou le ver-sène [18].

L'activité lytique semble due à la présence, dans ces lysats,

d'une substance de nature vraisemblablement protéique et qui sera désignée sous le nom d'*endolysine*. Les propriétés de l'*endolysine* sont décrites dans un autre mémoire [48]. Il suffit d'indiquer que l'activité lytique n'est pas spécifique puisqu'elle s'exerce sur les souches d'*E. coli* qui n'adsorbent pas le phage  $\lambda$  (souche B) ou même sur d'autres espèces telles que *H. influenzae*.

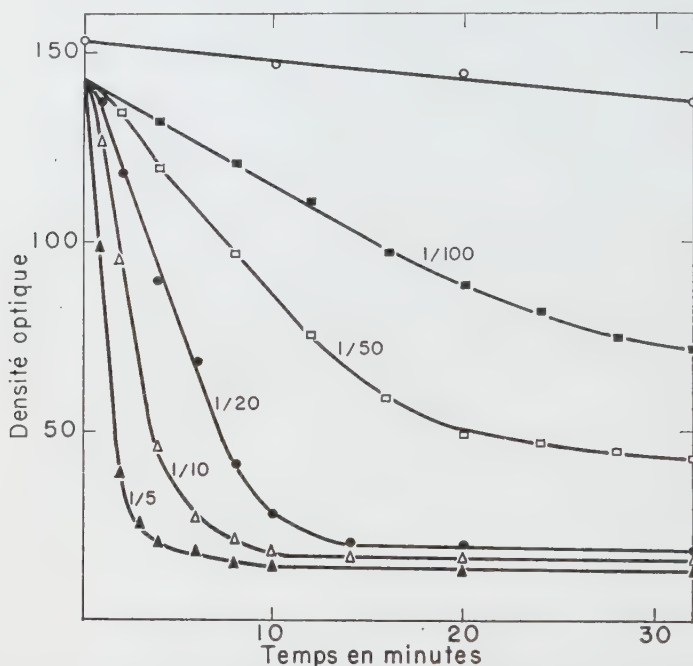


FIG. 2. — Dosage de l'*endolysine*. — Des bactéries *E. coli* B en voie de croissance sont centrifugées, lavées et remises en suspension dans une solution 0,1 M de versène (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique), à pH 8. Après cinq minutes, les bactéries sont centrifugées, lavées et remises en suspension dans de l'eau. Cette suspension est mélangée (temps 0) à parties égales avec différentes dilutions d'un lysat obtenu par induction de bactéries défectives P32. On mesure alors les variations de densité optique sur les mélanges maintenus à température ordinaire. En ordonnée, la densité optique ; en abscisse, le temps en minutes.

Son action paraît s'exercer sur l'un des composants de la paroi des bactéries traitées par le versène, car en présence de sucrose 2 M les bactéries traitées par l'*endolysine* perdent leur forme caractéristique et se transforment en petites sphères. Celles-ci, comme les protoplastes obtenus par action du lysozyme, sont très sensibles aux variations de pression osmotique. L'*endolysine* peut être dosée par des déterminations cinétiques de la lyse de préparations bactériennes standard (fig. 2).



Des substances analogues à cette endolysine ont été également mises en évidence dans les lysats formés par d'autres bactériophages (T2, T5 et 21). Elles sont vraisemblablement comparables aux lysines décrites par certains auteurs [9, 10, 11, 12]. C'est l'étude des souches défectives qui permet de préciser le rôle joué par l'endolysine dans les processus de lyse par le phage.

2° RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES SOUCHES DÉFECTIVES. — Si l'endolysine, mise en évidence dans les lysats de bactéries lysogènes normales, intervient dans le mécanisme de la lyse par le phage, elle doit être formée exclusivement par les souches défectives qui se lysent après induction. C'est bien ce que vérifient les expériences dont les résultats sont rapportés sur le tableau I (colonnes 4 et 5). L'activité endolytique existe en quantité normale dans les lysats de toutes les souches défectives qui se lysent.

TABLEAU I. — Propriétés des souches défectives étudiées.

Souches	Production induite	Rendement moyen induit	Distribution des productions individuelles	Lyse après irradiation	Présence d'endolysine 150 min. après irradiation	RR = $hc^+/hc$ après infection		RPM après infection		Antigène C bloquant	Présence de particules défectives après surinfection
						0 mn	45 mn	0 mn	45 mn		
P16	$10^{-5}$	11	C	+	+	8,3	20,0	1,8	4	+	+
P17	$10^{-5}$	9	C	+	+	5,7	10,3	1,8	4,3	+	..
P18	$3 \cdot 10^{-5}$	12	..	+	+	7,6	21,2	1,9	5,2	+	+
P19	$10^{-4}$	13	..	+	+	6,9	10	1,8	3,5	+	..
P21	$10^{-5}$	8	C	+	+	8,6	23	1,7	4,8	+	..
P22	$10^{-6}$	59	N	0	0	1,2	1,1	1,7	1,8	0	+
P30	$10^{-6}$	151	N	0	0	2,9	2,7	1,8	4,1	+	+
P32	$10^{-6}$	127	N	+	+	4,9	5,2	1,7	1,9	0	+
P34	$10^{-7}$	114	N	+	+	4,3	4,8	1,75	0,77	+	..

\* C = distribution clonale type Luria [19]; N = distribution normale analogue à celle trouvée chez les bactéries lysogènes normales. \*\* Non recherché. Les détails concernant les différentes méthodes d'étude sont donnés dans le texte.

Au contraire, on ne peut trouver trace d'activité lytique dans les extraits des souches qui ne se lysent pas. Cependant, chez ces dernières bactéries induites, puis surinfectées par du phage  $\lambda$ , la lyse survient normalement et l'on peut déceler dans les lysats

des quantités normales d'endolysine. Il paraît peu douteux que la lyse bactérienne consécutive au développement du phage  $\lambda$  soit liée à la formation d'endolysine.

L'activité endolytique apparaît entre la trentième et la quarantième minute qui suit l'irradiation, c'est-à-dire au milieu de la période latente (fig. 3). L'addition de KCN ou de chloromycé-

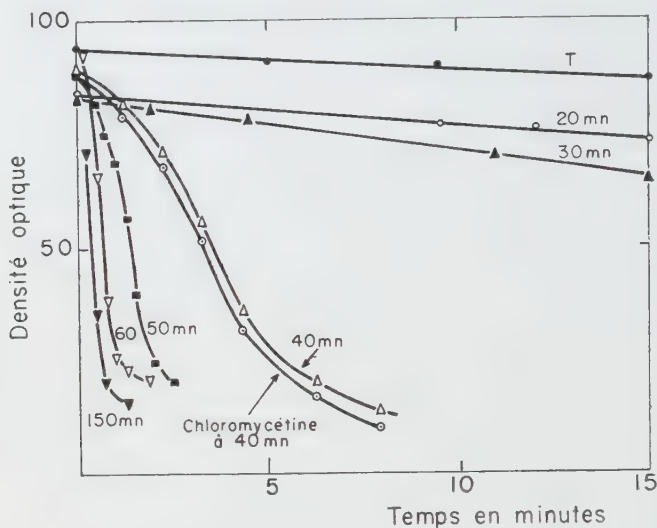


FIG. 3. — Variations de l'activité endolytique au cours de la période latente. — Une culture de bactéries défectives P32 est induite à temps 0 par le rayonnement U. V., puis agitée à 37°. A des temps variables, des échantillons sont refroidis dans l'eau glacée, puis soumis à l'action d'un « Raytheon » pendant dix minutes. L'activité endolytique est mesurée sur des suspensions d'*E. coli* B, préalablement traitées par du versène, selon le processus décrit dans la légende de la figure 2. En outre, à un échantillon prélevé à quarante minutes, on ajoute de la chloromycétine (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cet échantillon est agité pendant quarante minutes à 37° et l'activité endolytique est mesurée comme précédemment. En ordonnée, la densité optique des suspensions d'*E. coli* B mélangées aux extraits ; en abscisse, le temps en minutes. Les nombres représentent les temps auxquels ont été prélevés les échantillons.

tine à la quarantième minute bloque presque instantanément l'augmentation de l'activité (fig. 3). Bien que non décisif, ce résultat suggère que l'apparition de l'activité endolytique correspond à la synthèse d'une protéine. L'éventualité d'une relation entre l'endolysine et certains constituants du phage sera discutée ultérieurement.

## B. — SYNTHÈSES LÉTALES DÉCLENCHÉES PAR L'IRRADIATION.

1° MÉTHODES D'ÉTUDE. — La dose de lumière ultraviolette nécessaire pour induire le développement du phage chez les bactéries lysogènes est plus faible que celle requise pour abolir la

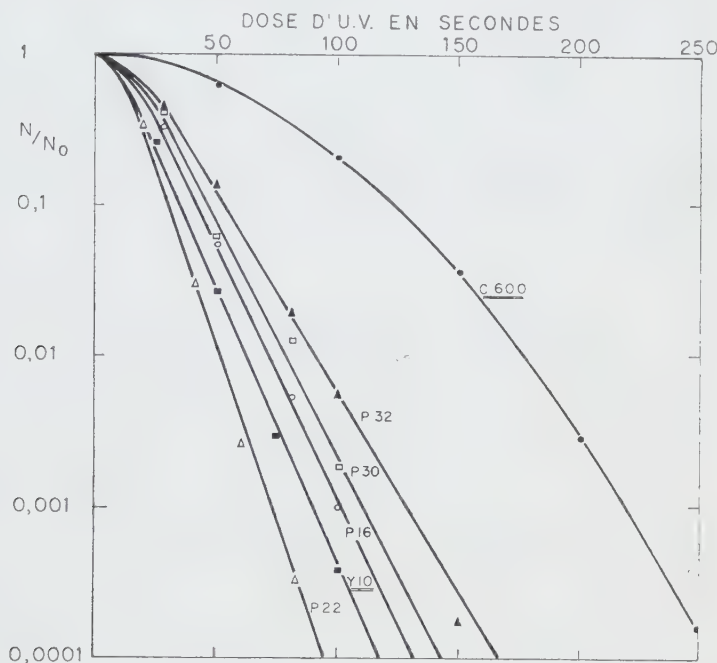


FIG. 4. — Courbes de survie des bactéries déficientes. — Des cultures de différentes souches déficientes sont exposées à des doses croissantes de lumière U. V. Après chaque irradiation, un échantillon est prélevé et, après dilution, est étalé sur gélose, ce qui permet de dénombrer les bactéries encore capables de former une colonie. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction des bactéries survivantes ; en abscisse, la dose d'U. V. en secondes. On a représenté également les courbes de survie de deux souches témoins d'*E. coli* K12 : lysogène normale Y10 et non lysogène C600.

capacité à former une colonie chez les bactéries non lysogènes homologues [3]. La présence d'un prophage inducible confère aux bactéries qui le perpétuent une sensibilité accrue à l'égard des agents inducteurs.

Chez les bactéries déficientes, la mesure de la sensibilité au rayonnement ultraviolet permet de rechercher si l'irradiation entraîne ou non un processus létal pour la bactérie-hôte. Si, en effet, une souche déficiente est aussi sensible qu'une souche lysogène

distribution clonale de type Luria, et, d'autre part, une augmentation du RR en fonction du temps d'infection, analogue à celle observée chez les bactéries lysogènes normales. Chez les autres, au contraire, les productions individuelles qui sont de taille élevée, sont distribuées normalement, comme celles des bactéries lysogènes normales et le RR reste constant quel que soit le moment de la période latente où les bactéries sont surinfectées. On observe une corrélation complète entre les renseignements apportés par les deux méthodes. L'examen des colonnes 3, 6 et 7 du tableau I montre, en effet, qu'aucune des souches chez lesquelles les productions individuelles sont analogues à celles des bactéries lysogènes normales, ne présente d'augmentation du RR. Inversement, toutes les souches où les productions individuelles sont réparties selon une distribution clonale présentent une augmentation du RR. La corrélation observée entre les résultats fournis par deux méthodes génétiques différentes (l'une mettant en jeu la mutabilité et l'autre la recombinaison) semble indiquer que c'est bien la multiplication végétative du génome que l'on révèle par ces deux méthodes. On peut conclure que, suivant la lésion du prophage, le génome est ou non capable de se multiplier végétativement après induction.

#### D. — ANTIGÈNE BLOQUANT LE POUVOIR INHIBITEUR D'UN SÉRUM SPÉCIFIQUE.

1° MÉTHODES D'ÉTUDE. — La neutralisation du phage par un immunsérum semble être due à l'inhibition, par les anticorps spécifiques, d'une protéine localisée dans la queue du phage et intervenant dans les processus d'adsorption sur les bactéries sensibles. Chez les souches défectives induites, on peut déceler la présence de cet antigène en mélangeant des quantités connues de lysat et d'immunsérum. L'existence d'antigène dans le lysat a pour effet de diminuer la concentration des anticorps libres du sérum, et par là même, son pouvoir neutralisant à l'égard d'une suspension standard de phages témoins. Cette méthode permet d'évaluer, avec une précision suffisante, la quantité d'antigène produit ainsi que sa répartition entre les particules sédimentables à une vitesse donnée et le surnageant [20, 2].

Chez les souches défectives qui ne se lysent pas après irradiation, l'antigène peut être recherché dans les préparations obtenues en traitant les bactéries par un appareil du type Raytheon, ce qui n'altère pas les propriétés antigéniques de la protéine.

2° RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES SOUCHES DÉFECTIVES. — La présence d'antigène bloquant a été systématiquement recherchée chez les souches défectives induites (voir tableau I, colonne 10). Ce



test permet de distinguer deux types de souches suivant qu'elles produisent ou non de l'antigène après induction. Dans la limite de précision entraînée par la méthode de dosage, il semble que, lorsque les souches défectives sont capables de former de l'antigène, elles en synthétisent des quantités équivalentes à celle trouvée chez les bactéries lysogènes normales.

#### E. — MÉLANGE PHÉNOTYPIQUE.

1° MÉTHODES D'ÉTUDE. — Il est possible de déceler, chez les bactéries défectives induites, la présence de la substance exprimant phénotypiquement la mutation  $h$  qui affecte le spectre d'activité de certains bactériophages. On sait que des bactéries, simultanément infectées par des mutants  $h$  et  $h+$  d'un même phage, produisent non seulement des particules génotypiquement et phénotypiquement  $h$  ou  $h+$ , mais aussi des particules de génotype  $h$  et phénotype ( $h+$ ), ainsi que des particules de type inverse [21]. L'existence de ce *mélange phénotypique* semble indiquer que le matériel génétique des particules  $h$  et celui des particules  $h+$  induisent l'un et l'autre la synthèse de substances spécifiques, vraisemblablement des protéines, qui sont ensuite mélangées (« pool »). Lors de la morphogenèse des particules infectieuses, l'assemblage des éléments se ferait au hasard et une particule végétative de génotype  $h$  aurait autant de chances de s'adjoindre une substance de type ( $h$ ) qu'une substance de type ( $h+$ ).

Un mutant  $h$  de  $\lambda$  a été récemment isolé [22]. Les deux types  $h$  et  $h+$  forment des plages sur les bactéries sensibles C600, mais seul le mutant  $h$  forme des plages sur une certaine souche K12.63 qui ne peut adsorber le type sauvage. Si des bactéries lysogènes normales K12( $\lambda h+$ ) sont induites puis, aussitôt après l'irradiation, infectées avec des mutants  $h$ , elles libèrent les deux types  $h$  et  $h+$ . Cependant, le nombre de plages formées par ces particules sur un mélange d'indicateur (C600 + K12.63 à parties égales) est plus élevé que celui formé par les mêmes particules sur K12.63 seul. Parmi les particules de génotype  $h$ , capables de former des plages sur la souche indicatrice K12.63, il existe donc deux catégories : celles de phénotype ( $h$ ) capables d'infecter directement K12.63, et d'autres de phénotype ( $h+$ ) qui ne peuvent infecter K12.63 qu'après un cycle de multiplication sur C600. Le rapport de mélange phénotypique (RMP) « nombre de plages sur mélange d'indicateur/nombre de plages sur K12.63 » permet donc d'estimer la proportion des deux types de substances présents au moment de la maturation.

Si le mélange phénotypique est bien la conséquence d'une

association au hasard entre les différents composants du phage, on doit, par cette méthode, pouvoir évaluer la synthèse de la substance ( $h^+$ ) au cours de la période latente. En effet, après irradiation, le prophage de type sauvage doit induire la synthèse de la substance homologue. Si l'on infecte tardivement, avec le mutant  $h$ , des bactéries préalablement induites, la synthèse de la substance de type ( $h$ ) sera en retard sur celle de type ( $h^+$ ). Le génome de type  $h$  aura donc plus de chance de s'adjoindre une substance ( $h^+$ ) qu'une substance de type ( $h$ ) et, parmi les

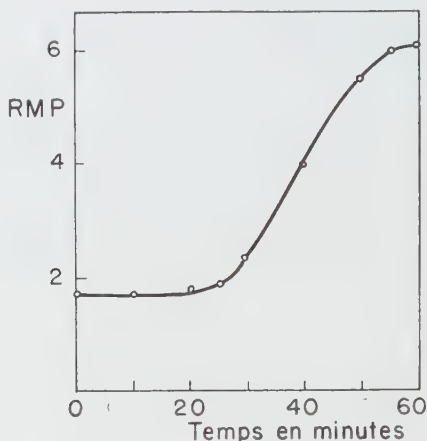


FIG. 5. — Variations du rapport de mélange phénotypique (R. M. P.), en fonction du temps de surinfection. — Une culture de bactéries lysogènes normales est induite par le rayonnement U. V., puis agitée à 37°. Des échantillons prélevés à temps variables sont infectés par un mutant  $\lambda hc$ , à raison d'environ 1 phage pour 5 bactéries. Après dix minutes d'adsorption, puis dix minutes d'action d'un sérum anti- $\lambda$ , les mélanges sont dilués en bouillon et maintenus deux heures à 37°. Des échantillons sont ensuite étalés sur gélose en présence, soit de bactéries indicatrices K12S,63 (qui n'adsorbent que les mutants  $h$ ), soit d'un mélange à parties égales de bactéries K12S,63 et de C600 (qui adsorbent les types  $h$  et  $h^+$ ). En ordonnée, le R. M. P. « nombre de plages formées sur mélanges C600 + K12S,63/nombre de plages formées sur la souche indicatrice K12S,63 » ; en abscisse, le temps d'infection en minutes écoulées depuis l'irradiation.

particules de génotype  $h$  formées, la proportion des phénotypes ( $h^+$ ) augmentera. La variation du RMP, en fonction du temps d'infection par le mutant  $h$ , devrait donc fournir une mesure de la synthèse de la substance ( $h^+$ ) au cours de la période latente.

Les résultats d'une telle expérience sont représentés sur la figure 5. On voit que, dans le cas des bactéries lysogènes normales, le RMP reste aux environs de 1,8 tant que l'infection

a lieu pendant les vingt-cinq à trente minutes qui suivent l'irradiation. Puis le RMP s'élève progressivement et atteint vers la cinquantième minute une valeur de 6 qui reste ensuite constante. Pour une particule génotypiquement *h*, la probabilité de s'adjoindre une substance de type (*h*) passe donc de 1/1,8 à 1/6. Tout se passe comme si la synthèse de la substance (*h*+) induite par le développement du prophage débutait vers la trentième minute et augmentait progressivement. A la cinquantième minute, temps auquel débute la maturation, la bactérie contiendrait un petit nombre d'équivalents-phages de cette substance. Les synthèses ultérieures de substance (*h*+) seraient compensées par la maturation, d'où l'établissement d'une réserve constante (pool) de 5 à 6 équivalents-phages. Ce résultat obtenu par l'analyse génétique est en complet accord avec les résultats apportés par l'étude cinétique de l'incorporation de <sup>35</sup>S dans les particules infectieuses de phage T2, donc par une technique entièrement différente [23].

2° RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES SOUCHES DÉFECTIVES. — On peut, chez les bactéries déficientes induites, rechercher la synthèse de substance (*h*+) en infectant les bactéries avec des particules du mutant *h*, immédiatement après l'irradiation, ou quarante minutes plus tard. Les résultats de telles expériences sont représentés sur les colonnes 8 et 9 du tableau I. Selon les valeurs du RMP observées, on est conduit à distinguer trois types de souches déficientes.

1° Avec certaines souches (telle P16), le RMP, qui est de 1,8 quand l'infection avec le mutant *h* a lieu aussitôt après l'irradiation, passe à 4 ou 5 quand l'infection a lieu quarante-cinq minutes plus tard. Ces souches se comportent donc comme la souche lysogène normale quant à la synthèse de substance (*h*+). L'irradiation entraîne ici une synthèse normale de substance (*h*+).

2° Pour d'autres souches (telle P32), le RMP est bien de 1,8 quand l'infection a lieu à temps 0, mais il reste voisin de cette valeur même lorsque l'infection a lieu tardivement. Chez ces souches, l'irradiation seule n'est donc pas suivie de synthèse de substance (*h*+). Celle-ci n'est déclenchée que si l'irradiation est suivie de surinfection. Tout se passe comme si le prophage déficient était incapable, soit d'effectuer l'une des réactions nécessaires à la synthèse de la substance (*h*+), soit de parvenir à une étape de son développement où est déclenchée cette synthèse. Le phage surinfectant effectuerait la réaction que ne peut accomplir le prophage et c'est seulement grâce à cette assistance que le génome déficient pourrait parvenir à synthétiser la substance (*h*+).

3° Avec une autre souche (P34), le RMP ne dépasse jamais 1,1 ou 1,2 quelle que soit la période de temps écoulée entre l'irra-

diation inductrice et la surinfection. Ces souches sont donc incapables de synthétiser la substance ( $h^+$ ).

On voit ainsi que, grâce à cette étude cinétique, il est possible de distinguer deux types de lésions affectant la synthèse de la substance ( $h^+$ ). Dans un premier type, la substance ( $h^+$ ) ne peut en aucun cas être produite. Dans l'autre, elle peut être produite, mais seulement lorsqu'une réaction est effectuée grâce à l'assistance d'un autre génome introduit par infection.

La synthèse de l'antigène bloquant et celle de la substance ( $h^+$ ) semblent être indépendantes. Après irradiation, la souche P34 est, en effet, capable de synthétiser une quantité normale d'antigène bloquant, mais non de produire du mélange phénotypique (voir tableau I, colonnes 8, 9 et 10). Il pourrait s'agir de deux composants distincts du phage, comme le suggérait déjà le fait que deux mutants  $h$  et  $h^+$  d'un même phage présentent la même sensibilité à l'action d'un sérum spécifique [24].

#### F. — LA FORMATION DE PARTICULES DÉFECTIVES.

1° MÉTHODES D'ÉTUDE. — Comme le prouvent les résultats des expériences décrites dans le paragraphe précédent, certains génomes défectifs ne peuvent assurer la synthèse de la substance ( $h^+$ ) que grâce à l'assistance d'un autre phage introduit par surinfection. Il est possible qu'un phage surinfectant soit capable de suppléer à d'autres déficiences d'un génome défectif, et lui permette ainsi de poursuivre son développement. Cette assistance apportée par le génome surinfectant au génome défectif devrait avoir pour conséquence la production, non seulement de particules infectieuses du type surinfectant, mais aussi de particules défectives contenant un génome de type prophage. De telles particules défectives ont été pour la première fois décelées par Appleyard [25] dans un lysat de bactéries défectives induites et surinfectées, grâce à la capacité qu'ont ces particules de lyso-géniser des bactéries sensibles et de reformer ainsi des systèmes défectifs.

La recherche systématique des particules défectives présente quelques difficultés. On peut cependant les mettre en évidence par différentes méthodes.

a) *Effet létal sur les bactéries sensibles.* — On peut rechercher si des particules défectives, c'est-à-dire incapables de former des plages, ne sont pas cependant capables de tuer des bactéries sensibles. On sait que l'enveloppe protéique des phages tempérés est dépourvue d'action létale sur les bactéries sensibles, contrai-



rement à celle du phage T2. Il est toutefois concevable que des particules défectives puissent s'adsorber sur les bactéries sensibles, y injecter leur génome et que celui-ci soit, du moins dans certains cas, encore capable de déclencher des synthèses létales pour la bactérie-hôte. Nous avons vu précédemment que de telles synthèses létales paraissent être induites par l'irradiation des bactéries défectives. Dans un lysat obtenu par induction de bactéries défectives, suivie de surinfection par un phage  $\lambda$  normal, le nombre des particules capables de tuer des bactéries sensibles devrait être plus élevé que celui des particules capables de former un centre infectieux.

b) *Lysogénisation*. — Certaines des réactions qui interviennent dans les processus de lysogénisation diffèrent des réactions nécessaires à la formation de particules infectieuses [26]. On peut donc concevoir l'existence d'un type de génome défectif, incapable de déclencher une phase végétative normale, mais capable cependant de lysogéniser des bactéries sensibles. Les bactéries ainsi lysogénisées seront par définition défectives, mais leur présence pourra être décelée par leur immunité caractéristique d'un prophage  $\lambda$ .

2° RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES SOUCHES DÉFECTIVES. — Les deux méthodes précédentes ont été appliquées à des lysats obtenus par irradiation de bactéries défectives, suivie d'infection par du phage  $\lambda c$ , incapable par lui-même de lysogéniser.

a) *Effet léta*. — Dans les quatre lysats défectifs étudiés, on trouve environ deux fois plus de particules capables de tuer des bactéries sensibles que de particules capables de former un centre infectieux (voir fig. 6). Après l'induction et la surinfection de ces bactéries défectives, il s'est donc formé un nombre de particules défectives sensiblement égal à celui des particules infectieuses. Ces particules défectives sont capables de s'adsorber et d'injecter leur génome qui déclenche des synthèses létales.

b) *Lysogénisation*. — En mélangeant des lysats et des suspensions de bactéries sensibles en proportions convenables, on peut obtenir des systèmes lysogènes défectifs identiques aux bactéries défectives initiales. On peut distinguer deux types de souches défectives selon que les particules défectives qu'elles produisent par surinfection sont ou non capables de lysogéniser en infection simple.

En effet, à *haute multiplicité* (4 à 5 particules infectieuses de  $\lambda c$ , et vraisemblablement un nombre équivalent de particules défectives, par bactérie sensible), les lysats étudiés produisent tous des systèmes lysogènes défectifs avec une même efficacité

(tableau III, colonnes 2 et 4). La proportion des bactéries lysogénisées est tout à fait comparable à celle que l'on observe dans les mêmes conditions, avec un mélange de  $\lambda c$  et de  $\lambda^+$ . A faible

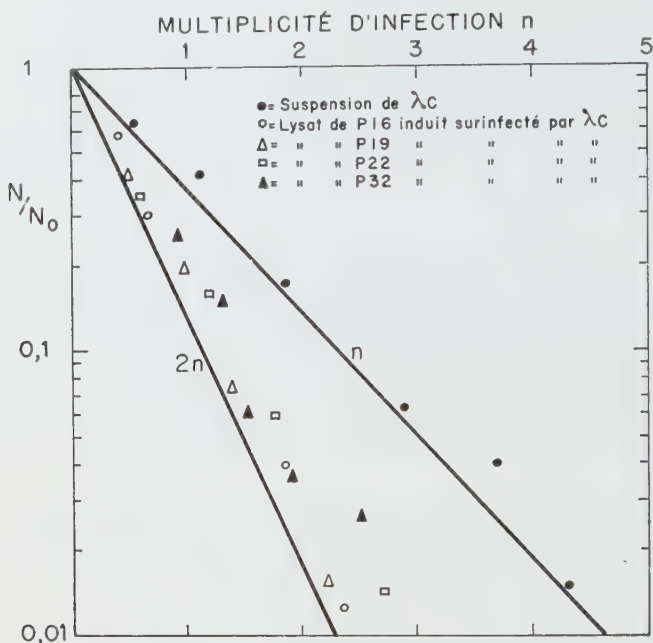


FIG. 6. — *Effet létal des particules défectives.* — Des cultures de bactéries défectives sont induites, puis aussitôt surinfectées à raison d'environ 1  $\lambda c$  par bactérie. Les lysats sont ensuite centrifugés, puis stérilisés par du chloroforme et l'on détermine leur teneur en particules infectieuses. Différentes dilutions de ces lysats sont ajoutées à des échantillons d'une suspension standard de bactéries sensibles C600 en  $SO_4Mg$ , M/100. Après quinze minutes à  $37^\circ$ , on détermine la fraction des particules infectieuses adsorbées et la fraction des bactéries survivantes. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction des bactéries survivantes. En abscisse, la multiplicité d'infection  $n$  calculée d'après le nombre de particules infectieuses adsorbées. La courbe  $n$  correspond à la courbe de survie théorique, calculée d'après une distribution de Poisson pour des bactéries ayant adsorbé en moyenne  $n$  particules. La courbe  $2n$  correspond à la courbe de survie théorique de bactéries ayant adsorbé  $2n$  particules. Les points représentent les résultats expérimentaux obtenus soit avec une suspension pure de  $\lambda c$ , soit avec les lysats formés par différentes souches défectives. On voit que, pour les lysats, ces points sont plus rapprochés de la courbe  $2n$  que de la courbe  $n$ .

*multiplicité*, au contraire (1 particule infectieuse de  $\lambda c$  ou 1 particule défective pour environ 5 bactéries), la proportion des bactéries infectées par une particule défective et qui deviennent lysogènes varie suivant les lysats (tableau III, colonnes 1 et 3).

TABLEAU III. — Lysogénisation par les particules défectives.

Souches Expérience n°	P16		P22	
	1	2	3	4
Bactéries sensibles C600/ml du tube d'adsorption	$11,7 \times 10^7$	$11,7 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$
Particules infectieuses de lysat/ml du tube d'adsorption	$2,9 \times 10^7$	$58 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$56 \times 10^7$
Particules infectieuses de lysat non adsorbé/ml	$0,5 \times 10^7$	$10,7 \times 10^7$	$0,7 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7$
Bactéries survivantes après infection	$9,9 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$7,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
Fraction des bactéries survivantes	0,85	0,26	0,83	0,31
Fraction des bactéries survivantes qui sont immunes	0,029	0,94	0,004	0,89
Multiplicité d'infection avec les particules infectieuses	0,21	4,1	0,23	5,1
Fraction des bactéries ayant reçu au moins une particule <u>défective</u> **	0,18	0,82	0,19	0,94
Fraction des bactéries ayant reçu au moins une particule <u>défective</u> + une particule <u>infectieuse</u> **	0,032	0,67	0,036	0,88
Fraction des bactéries ayant reçu une particule <u>défective</u> et devenues immunes	0,19	0,33	0,021	0,34

Parmi la fraction des bactéries survivantes qui sont immunes, plus de 90 p. 100 des bactéries immunes sont lysogènes défectives. Une très petite fraction produit également des particules infectieuses du type  $\lambda c$ . \*\* Calculée d'après la distribution de Poisson en faisant l'hypothèse que les lysats contiennent autant de particules défectives que de particules infectieuses. Des bactéries défectives sont induites par le rayonnement U.V., puis infectées à raison d'environ 1  $\lambda c$  par bactérie. Les lysats sont ensuite centrifugés et chloroformés. A 0,9 ml d'une suspension de bactéries sensibles C600 en  $SO_4Mg$  M/50, on ajoute 0,1 ml de deux dilutions des lysats. Après quinze minutes à 37°, les suspensions sont diluées et les bactéries survivantes sont étalées sur gélose où elles forment des colonies. Dans chaque cas, 1 200 colonies sont réisolées et analysées, par la méthode des décalques, pour leur capacité à produire du phage et leur immunité à l'égard de phages  $\lambda+$ ,  $\lambda c$  et  $\lambda v$ . Les bactéries présentant une immunité caractéristique sont réisolées trois fois et leurs propriétés vérifiées.

Avec les lysats produits par certaines souches (type P16), le pouvoir lysogénisant des particules défectives reste élevé et analogue à celui que présentent, dans les mêmes conditions, les particules infectieuses de  $\lambda+$  (soit environ la moitié de celui observé à haute multiplicité [27]). Avec les lysats produits par d'autres souches (type P22), le pouvoir lysogénisant apparaît fortement réduit (quinze à vingt fois plus faible qu'à haute multiplicité). Encore la fraction des bactéries lysogénisées semble-t-elle correspondre à la fraction des bactéries ayant reçu une particule défective et une particule infectieuse  $\lambda c$ .

L'étude des particules défectives permet de tirer plusieurs conclusions.

a) Le développement d'un génome normal rend possible celui

de certains génomes défectifs. Ceci se traduit par la formation de particules défectives.

b) Les particules défectives ont des propriétés analogues à celles des particules normales : stabilité, sensibilité à l'égard d'agents inactivants tels que le sérum, capacité à s'adsorber sur des bactéries sensibles et y injecter leur génome. Celui-ci est incapable de former de nouvelles particules infectieuses, mais reste souvent capable de déclencher des synthèses létales.

c) Certaines particules défectives semblent avoir perdu le pouvoir de lysogéniser en infection simple. Les génomes correspondants ne peuvent se transformer en prophage qu'avec l'assistance d'un génome normal.

★★

Cette liste des processus que l'on peut distinguer et étudier au cours du développement du phage n'est nullement exhaustive. C'est ainsi que l'analyse des lysats au microscope électronique permet de rechercher l'existence de particules présentant une analogie morphologique avec des particules de phages ou certains éléments de ces particules [28]. L'étude morphologique des produits formés par nos souches défectives n'a pas encore été faite. Les processus que nous venons de décrire dans cette première partie apparaissent cependant suffisamment variés pour permettre une première classification de nos souches.

## II. — LES DIFFÉRENTS TYPES DE SOUCHES DÉFECTIVES

Après avoir exposé les méthodes générales permettant d'étudier les souches défectives, nous allons tenter de préciser les caractéristiques de chacune de nos souches. Nous envisagerons tout d'abord la lésion génétique en cause et sa localisation sur le groupe de liaison du prophage  $\lambda$ . Nous essaierons ensuite de déterminer les perturbations apportées par cette lésion aux processus intervenant dans la synthèse du phage.

### A. — LA NATURE PROPHAGIQUE DES LÉSIONS ET LEUR LOCALISATION GÉNÉTIQUE.

Nous avons vu, dans un précédent mémoire de cette série, que plusieurs méthodes permettent d'établir si le caractère défectif est bien la conséquence d'une mutation du prophage et de localiser cette mutation sur le groupe de liaison du prophage [2]. Nous nous bornerons ici à rappeler les deux méthodes les plus démonstratives.



1° SURINFECTION DES BACTÉRIES DÉFECTIVES INDUITES. — Lorsque les bactéries déficientes, appartenant à n'importe laquelle des souches étudiées ici, sont irradiées puis infectées avec du phage  $\lambda$  normal, toutes les bactéries infectées produisent du phage en quantité normale. Ce résultat démontre bien que le caractère déficient de ces souches n'est pas le fait d'une lésion de la bactérie, mais du prophage qui est incapable de se développer.

Si les bactéries déficientes sont induites, puis surinfectées par un mutant  $\lambda$ , elles produisent surtout des particules de type surinfectant et, en quantités plus faibles et variables d'une souche à l'autre, des particules de type prophage ou de types recombinants. L'hypothèse la plus simple pour expliquer ces résultats



FIG. 7. — Localisation schématique des mutations déficientes sur le groupe de liaison du phage  $\lambda$ . — Les chiffres placés sous la ligne représentent la proportion (en p. 100) des recombinants formés dans les croisements entre phages différents par deux caractères (méthode de surinfection des bactéries lysogènes normales induites). Les différents caractères déficients sont désignés par la lettre  $d$ , affectée d'un numéro correspondant à la souche déficiente homologue ( $d_{22}$  représente le caractère déficient porté par le prophage de la souche P22). La localisation approximative des caractères, obtenus grâce à des expériences de surinfection des bactéries déficientes avec différents mutants de  $\lambda$ , est indiquée en pointillés.

est que les particules possédant le caractère déficient  $d$  du prophage sont déficientes et n'apparaissent pas comme particules infectieuses. En infectant, avec différents mutants de  $\lambda$ , les bactéries déficientes induites, et en déterminant les classes de recombinants absents ou trop rares, on parvient à localiser approximativement le caractère déficient d'une souche donnée sur le groupe de liaison du prophage.

De telles expériences de surinfection de bactéries déficientes induites avec des mutants du phage  $\lambda$  ont été faites systématiquement avec les souches déficientes. Les résultats permettent de localiser approximativement les différents caractères déficients  $d$  selon le schéma représenté sur la figure 7. On y voit que différentes régions du prophage peuvent être intéressées par les mutations. La région la plus fréquemment affectée est celle des marqueurs  $m_5$  et  $g_1$ , où se trouvent localisés plus de la moitié

des caractères étudiés. Les autres mutations étudiées intéressent la région comprise entre les marqueurs *h* et *c*. Aucune des souches ne porte de lésions génétiques dans la région comprise entre *c* et *m*<sub>1</sub> qui représente cependant le tiers du groupe de liaison. Etant donné le petit nombre de souches étudiées, il est encore trop tôt pour savoir si c'est là un effet du hasard ou si, au contraire, une lésion du génome dans cette région est incompatible avec l'état de prophage.

2° CROISEMENTS ENTRE GÉNOMES DÉFECTIFS. — Les expériences de recombinaison génétique entre génomes défectifs permettent également de rechercher si le caractère défectif est bien le fait d'une mutation du prophage. Deux génomes défectifs différents  $d_1 d_1^+$  et  $d_1^+ d_2$ , présents simultanément dans une même bactérie, devraient être capables, soit de *coopérer*, ce qui se traduirait par la formation de particules défectives, soit de *se recombinaisonner*, ce qui entraînerait la formation de particules infectieuses contenant le génome de type sauvage  $d_1^+ d_2^+$ .

Les croisements entre génomes défectifs ne peuvent être réalisés par les techniques habituelles de croisements entre phages car on ne peut pas obtenir des préparations pures de particules défectives. Il est cependant possible d'utiliser des croisements entre bactéries Hfr et F<sup>-</sup>, toutes deux défectives mais possédant chacune un prophage défectif différent. Lorsque des bactéries Hfr lysogènes sont croisées avec des bactéries F<sup>-</sup> également lysogènes et induites avant le croisement, la moitié des bactéries F<sup>-</sup> reçoit du parent Hfr un segment chromosomique portant le prophage  $\lambda$ . Ces bactéries produisent alors les deux types de phages et éventuellement des recombinants [29]. Si les bactéries Hfr et F<sup>-</sup> perpétuent des prophages défectifs différents, chacune d'elles est incapable de produire du phage et les seules particules infectieuses formées dans un tel croisement seront le fait de recombinaisons entre les génomes défectifs. Les particules recombinantes seront d'autant plus nombreuses que les deux caractères défectifs  $d_1$  et  $d_2$  seront plus éloignés l'un de l'autre sur le groupe de liaison du prophage.

Les résultats de telles expériences sont représentés sur le tableau IV. On y voit que le nombre des centres infectieux formés dans les croisements entre souches perpétuant des prophages défectifs différents est très supérieur à celui des centres infectieux formés, soit par l'une des souches parentales seule, soit dans les croisements entre bactéries perpétuant le même prophage défectif. L'excès des centres infectieux formés au cours des croisements entre bactéries défectives différentes démontre la possibilité de recombinaison génétique entre génomes défectifs. Les distances

TABLEAU IV. — Croisements entre bactéries défectives.

Témoin Hfr( $\lambda_{d_{30}}$ ) seul	10 centres infectieux/ml		
Témoin F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{14}}$ ) U.V. seul	$8 \times 10^1$	"	"
Croisement Hfr( $\lambda_{d_{30}}$ ) x F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{14}}$ ) U.V.	$12 \times 10^5$	"	"
Témoin F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{17}}$ ) U.V. seul	$23 \times 10^2$	"	"
Croisement Hfr( $\lambda_{d_{30}}$ ) x F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{17}}$ ) U.V.	$8,1 \times 10^5$	"	"
Témoin F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{22}}$ ) U.V. seul	$3,5 \times 10^1$	"	"
Croisement Hfr( $\lambda_{d_{30}}$ ) x F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{22}}$ ) U.V.	$1,7 \times 10^5$	"	"
Témoin F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{30}}$ ) U.V. seul	$3,9 \times 10^1$	"	"
Croisement témoin Hfr( $\lambda_{d_{30}}$ ) x F <sup>-</sup> ( $\lambda_{d_{30}}$ ) U.V.	$4,4 \times 10^1$	"	"

Des cultures bactériennes de différentes souches défectives Hfr S<sup>s</sup> et F<sup>-</sup> S<sup>r</sup> en voie de croissance exponentielle sont ajustées à la concentration de  $10^8$  bactéries/ml. A 1,9 ml de bactéries F<sup>-</sup> préalablement exposées à une dose inductrice d'U.V., est ajouté 0,1 ml de bactérie Hfr. Les témoins de chaque souche sont préparés de la même façon par addition d'une quantité convenable de bouillon. Après cinquante minutes d'agitation à 37°, des échantillons sont dilués et étalés sur gélose à la streptomycine en présence de bactéries indicatrices du phage  $\lambda$ , résistantes à la streptomycine, ce qui permet de dénombrer les centres infectieux.

relatives entre deux caractères défectifs peuvent être estimées d'après la fréquence des centres infectieux formés au cours de croisement standard, et les résultats sont en accord avec ceux déterminés par la méthode de surinfection.

#### B. — LES EFFETS DES DIFFÉRENTES MUTATIONS DÉFECTIVES.

L'analyse génétique précédente a révélé que les mutations défectives peuvent intéresser différentes régions du génome du prophage. Nous allons rechercher maintenant si l'on peut distinguer, parmi les souches défectives, des types physiologiques correspondant aux diverses mutations.

Les méthodes d'étude décrites dans la première partie de ce travail ont été appliquées systématiquement aux souches défectives. Les résultats expérimentaux sont décrits dans le tableau I et un résumé des capacités de synthèse observées chez les différentes souches est donné dans le tableau V. L'examen du

tableau V montre que l'on peut distinguer deux types de souches défectives.

1° Les souches (P16, P17, P18, P19, P21) paraissant capables d'effectuer toutes les synthèses que nous savons reconnaître. La multiplication végétative du génome s'effectue normalement après induction, ainsi que les synthèses d'antigène bloquant, de substance ( $h^+$ ) et d'endolysine. Chez ces souches, les mutations

TABLEAU V. — Les différents types de souches défectives.

Souches	Multiplication végétative du génome	Synthèse d'endolysine	Synthèse d'antigène bloquant	Synthèse de substance ( $h^+$ )	Production de particules défectives après surinfection par un phage normal	Lysogénisation par les particules défectives en infection simple
P16	+	+	+	+	+	+
P17	+	+	+	+	*	*
P18	+	+	+	+	+	+
P19	+	+	+	+	*	*
P21	+	+	+	+	*	*
P22	0	0	0	A**	+	0
P30	0	0	+	+	+	0
P32	0	+	0	A**	+	0
P34	0	+	+	0	*	*

+ accomplit le processus après induction ; 0 ne peut pas accomplir le processus après induction. \* Non recherché. A\*\* Peut accomplir le processus après induction, seulement grâce à l'assistance d'un phage surinfectant normal. Ce tableau résume les résultats obtenus par l'analyse des propriétés décrites dans le tableau I.

défectives du prophage affectent vraisemblablement un ou plusieurs processus que nous ne savons pas déceler. Comme le défaut entraîné par ces mutations n'affecte pas les autres processus, il s'agit vraisemblablement de réactions *tardives*, dont les produits sont nécessaires seulement à la morphogénèse des particules infectieuses. L'examen systématique des lysats au microscope électronique permettra peut-être de préciser les effets de certaines de ces réactions.

Dans toutes ces souches, comme dans la souche P14 où une réaction de morphogénèse paraît également être altérée [2], les mutations défectives du prophage semblent être localisées sur

un même segment du génome phagique, près des caractères  $m_3$  et  $g_1$  (voir fig. 7).

2° Les souches (P22, P30, P32 et P34) chez lesquelles plusieurs des synthèses identifiables paraissent simultanément inhibées. Dans ces quatre souches, non seulement on n'observe pas de multiplication végétative du génome après induction, mais encore une ou plusieurs substances ne sont pas synthétisées. Les expériences génétiques semblent bien indiquer que, dans ces souches, une seule mutation du prophage peut être mise en cause. Il semble donc peu probable que le locus muté gouverne directement les synthèses altérées. Plus vraisemblablement, le développement du phage implique une séquence de réactions, telle que le blocage d'une réaction *précoce* entraînerait l'arrêt des synthèses ultérieures.

Alors que les particules défectives formées par les bactéries du premier groupe peuvent lysogéniser des bactéries sensibles en infection simple, les particules défectives formées par les souches du second groupe en sont incapables (voir tableau V, colonne 6). Ces dernières ne peuvent lysogéniser qu'en infection mixte, grâce à l'assistance d'un autre phage, tel que  $\lambda c$ , lui-même incapable de lysogéniser. Il est vraisemblable que l'incapacité de ces génomes défectifs à lysogéniser est la conséquence de leur incapacité à se multiplier.

Chez les quatre souches du second groupe, les mutations défectives paraissent intéresser des régions du prophage différentes de celles qui sont affectées dans les souches du premier type. Elles sont localisées notamment dans la région du caractère  $c$  et dans la région comprise entre  $h$  et  $c$ .

## DISCUSSION

Les expériences décrites dans ce mémoire démontrent la diversité des souches lysogènes défectives. D'une part, les mutations défectives peuvent intéresser différentes régions du groupe de liaison du prophage. D'autre part, divers processus qui interviennent au cours de la synthèse des constituants du phage et de la morphogénèse peuvent être perturbés. Il semble bien qu'à différentes lésions génétiques correspondent différentes modifications physiologiques. Encore que les résultats présentés ici soient très incomplets, ils apportent quelques précisions sur le mécanisme du développement du phage.

*Les étapes du développement du phage.* — L'analyse des souches défectives a mis en évidence deux sortes d'étapes intervenant au cours du développement du phage.



1° Des étapes *précoces*, formées vraisemblablement par une ou plusieurs séquences de réactions, telles que le blocage d'une réaction empêche l'accomplissement de réactions ultérieures. Ceci se traduit par une perturbation de plusieurs processus.

2° Des étapes *tardives*, vraisemblablement indépendantes. Les produits de ces réactions sont nécessaires à la formation de particules infectieuses, mais le blocage de l'une de ces réactions n'empêche pas les autres processus de s'accomplir.

L'existence d'une séquence de réactions précoces est également démontrée par le phénomène d'*assistance* apportée au développement d'un génome défectif par un génome normal. Nous avons vu qu'après induction, certains génomes défectifs sont incapables de se multiplier végétativement ou de synthétiser certains éléments du phage tel que la substance ( $h^+$ ). Si les bactéries induites sont surinfectées par un phage  $\lambda$  normal, le génome défectif peut accomplir ces deux processus comme en témoignent, d'une part la formation de particules défectives et, d'autre part, l'existence d'un mélange phénotypique dont la valeur reste constante, que les bactéries soient surinfectées tôt ou tard. Ici, la lésion génétique du prophage ne gouverne pas directement la multiplication végétative du génome ou la synthèse de la substance ( $h^+$ ). Selon toute vraisemblance, elle perturbe une réaction antérieure, nécessaire à l'accomplissement de ces deux processus. Si la réaction déficiente est effectuée par un autre génome, introduit par surinfection, les produits de la réaction peuvent être utilisés pour le développement du génome défectif.

Les étapes inhibées dans ces souches défectives, qu'elles soient précoces ou tardives, sont encore inconnues. Le petit nombre des souches étudiées ne permet évidemment pas de se former encore une idée, ni sur le nombre, ni sur la séquence de ces réactions. Il semble que plusieurs étapes doivent être parcourues avant que ne débute la multiplication végétative du génome : les quatre souches chez lesquelles l'irradiation ne déclenche pas cette multiplication semblent être bloquées à des étapes différentes, puisque leur pouvoir de synthétiser les autres substances paraît être différent. L'une au moins de ces réactions peut être effectuée grâce à l'assistance apportée par un génome normal surinfectant. Les produits de cette réaction sont utilisés par le génome défectif pour effectuer sa multiplication, comme en témoigne la formation de particules défectives. Il se pourrait que l'une de ces réactions précoces consiste dans la synthèse d'une protéine, ainsi que l'a suggéré l'étude des effets exercés par la chloromycétine sur la multiplication du phage T2 [32].

La complexité des réactions en jeu est encore soulignée par l'action létale exercée, soit après induction, soit après infection, par le génome défectif d'une souche telle que P22, chez laquelle

l'induction ne provoque aucune des synthèses décelables, en absence de surinfection. Pour expliquer cet effet létal, il faut admettre que de tels génomes défectifs sont capables d'induire certaines synthèses vraisemblablement très précoces. Nous ne savons pas encore identifier les produits de ces synthèses, mais elles se manifestent à nous par leur effet létal.

Un dernier point mérite d'être souligné. Certaines souches, telles que P30 et P34 paraissent, après induction, capables de synthétiser des quantités normales de certaines protéines en l'absence de surinfection, alors que dans les mêmes conditions, on ne peut déceler aucune multiplication végétative du génome. Cette dissociation pose naturellement le problème des rapports existant entre synthèse de protéines et d'ADN, au cours du développement du phage. Il faut rappeler, une fois encore, que la multiplication végétative du génome, dont on a tout lieu de penser qu'elle correspond à la replication de l'ADN phagique, ne peut actuellement être mesurée que par des méthodes génétiques. On ne connaît pas de méthodes chimiques permettant de distinguer ADN phagique et ADN bactérien dans le cas des systèmes tempérés. Chez les souches P30 et P34, on ne peut donc exclure la possibilité d'une synthèse d'ADN qui, bien que ne pouvant pas former de génomes végétatifs capables de se recombinaison, pourrait cependant contribuer à des synthèses protéiques. Si, au contraire, la multiplication végétative du génome s'avérait bien témoin de la synthèse d'ADN phagique, on devrait admettre que des protéines phagiques peuvent être synthétisées en l'absence de synthèse d'ADN phagique.

*Relations entre multiplication végétative du génome et lysogénisation.* — L'étude de la lysogénisation par les particules défectives apporte encore quelques renseignements concernant les processus de lysogénisation. Selon toute vraisemblance, les particules défectives correspondent à la présence, dans une enveloppe protéique, d'un génome défectif identique à celui du prophage perpétué par la souche qui les a formées après induction et surinfection.

Ces particules paraissent capables, au moins dans certains cas, de s'adsorber sur des bactéries sensibles et d'y injecter leur génome défectif. Ce dernier peut alors amorcer son développement qui, comme celui de tout phage tempéré, va évoluer, soit vers la production, soit vers la lysogénisation. Toutefois, en infection simple, ces deux processus se limitent aux réactions qui ne sont pas inhibées par la mutation défective. On conçoit donc que l'étude de la lysogénisation par les particules défectives puisse apporter des précisions sur les réactions qui interviennent dans la transformation de la particule infectante en prophage.

Ce qui est frappant, dans le cas des souches étudiées, c'est que les lésions qui inhibent les processus de lysogénisation semblent bien être celles qui empêchent également la multiplication du génome (voir tableau V, colonnes 1 et 6). Les particules défectives produites par les souches dont la lésion affecte une réaction tardive, qui n'empêche pas la multiplication du génome, sont capables de lysogéniser en infection simple. Au contraire, les particules défectives formées par les souches chez lesquelles la perturbation d'une réaction précoce empêche la multiplication du génome en sont incapables. La lysogénisation par de telles particules n'est possible qu'en infection mixte. Selon toute vraisemblance, le génome du phage surinfectant, même lorsqu'il est lui-même incapable de lysogéniser comme  $\lambda_c$ , peut effectuer la réaction bloquée chez le génome défectif et permettre à celui-ci d'atteindre un stade de la multiplication nécessaire à l'intégration en tant que prophage. Le même effet d'assistance par un génome normal permet au génome défectif, soit de se multiplier, soit de lysogéniser. C'est à une conclusion analogue qu'a déjà conduit l'étude des particules de phage  $\lambda$  capables de transduire le caractère galactose. Les génomes contenus dans ces particules ne sont capables, ni de se multiplier, ni de lysogéniser des bactéries sensibles en infection simple. En infections mixtes, ils peuvent lysogéniser et forment des systèmes défectifs [33]. Dans ce cas, le caractère défectif paraît lié à la présence d'un segment génétique bactérien, portant le caractère galactose et étroitement uni au génome phagique.

La corrélation observée entre multiplication végétative du génome d'une part, et pouvoir de lysogéniser d'autre part, suggère qu'un certain degré de multiplication, ou du moins certaines synthèses, sont nécessaires pour permettre la lysogénisation. Celle-ci ne saurait donc correspondre à l'incorporation pure et simple du génome phagique infectant dans le génome bactérien.

*Le mécanisme de la lyse par le phage.* — L'étude comparative des diverses souches défectives apporte des renseignements sur le mécanisme de la lyse par le phage, et, en particulier, sur le rôle de l'endolysine. C'est en effet la corrélation observée entre la lyse des souches défectives après induction et la présence d'endolysine qui permet d'attribuer à celle-ci un rôle direct dans les processus de lyse.

Chez les bactéries lysogènes induites, l'activité endolytique commence à apparaître au moment où se forment les premières particules infectieuses de phage. On peut alors se demander quelle relation existe entre l'endolysine et le phage. L'endolysine pourrait correspondre à l'un des constituants du phage et, en particulier, à ceux qui sont connus pour exercer une action

enzymatique sur certains antigènes bactériens [30, 31]. L'endolysine pourrait également être une substance qui n'entre pas dans la constitution du phage, mais représente un « sous-produit » de son développement. La question ne peut encore qu'être posée, et les arguments expérimentaux sont encore insuffisants pour y répondre. Signalons, cependant, que les sérums anti- $\lambda$  n'inhibent pas l'activité endolytique des lysats, que dans les conditions où l'endolysine agit, les préparations purifiées de phage  $\lambda$  ne manifestent qu'une activité lytique extrêmement réduite. Si l'endolysine est un constituant du phage, elle doit être enfermée dans l'enveloppe protéique et l'activité endolytique doit être recherchée sur des préparations purifiées de particules infectieuses que l'on a préalablement fait éclater.

Nous tenons à remercier M<sup>me</sup> Yannick Stampfli et M<sup>lle</sup> Michèle Fiquet pour l'aide qu'elles nous ont apportée dans la réalisation de ce travail.

### RÉSUMÉ

1° Différentes souches lysogènes défectives ont été isolées à partir d'*E. coli* K12( $\lambda$ ). Ces souches perpétuent un prophage  $\lambda$  mais ne peuvent former des particules infectieuses.

2° Des méthodes sont décrites qui permettent d'étudier, chez les bactéries défectives induites, la multiplication végétative du génome phagique, la synthèse d'antigène bloquant, la synthèse de la substance ( $h^+$ ) expression phénotypique de la mutation  $h$ , la synthèse d'endolysine, substance protéique intervenant dans les processus de la lyse bactériophagique et la formation de particules défectives.

3° L'application systématique de ces méthodes aux souches défectives permet de distinguer deux sortes de souches suivant le type de lésion physiologique qui empêche la formation de particules infectieuses. Chez certaines souches, une étape précoce du développement du phage paraît bloquée. Ceci entraîne une perturbation de plusieurs processus intervenant dans la multiplication du phage. Chez d'autres souches, le blocage d'une étape tardive paraît empêcher la morphogenèse des particules infectieuses, sans toutefois retentir sur les autres processus.

4° Le caractère défectif de toutes les souches étudiées est dû à des mutations du prophage. Les mutations défectives provoquant une perturbation des réactions précoces sont localisées dans une région du chromosome phagique comprise entre les caractères  $h$  et  $c$ . Celles affectant des réactions tardives sont localisées dans une autre région, près des caractères  $m_5$  et  $g_1$ .

5° L'analyse de ces souches défectives permet d'apporter quelques éclaircissements sur certaines étapes du développement du phage, sur les processus de lysogénisation et sur le mécanisme de la lyse bactériophagique.

## SUMMARY

### STUDY OF DEFECTIVE LYSOGENIC BACTERIA.

#### II. — PHYSIOLOGICAL TYPES RESULTING FROM PROPHAGE MUTATIONS.

1° A variety of defective lysogenic strains was isolated from *E. coli* K12( $\lambda$ ). These strains carry a prophage  $\lambda$  but are unable to produce infectious particles.

2° Methods are described which allow one to study the vegetative multiplication of the phage genome, the synthesis of serum blocking antigen, the synthesis of substance ( $h$ +) phenotypic expression of the  $h$  mutation, the synthesis of endolysin, protein substance playing a role in the process of lysis by phage and the formation of defective particles.

3° These methods, when applied to defective strains, allow one to distinguish two kinds of strains. In some of them, an early step of phage development is blocked, which results in a disturbance of several processes taking part in phage multiplication. In other strains, a late step is blocked, which prevents morphogenesis of phage particles, without disturbing other processes.

4° The defective character of all these strains may be ascribed to prophage mutations. Defective mutations which alter an early step of phage development seem to be located in a given region of the phage linkage group, between the  $h$  and  $c$  markers. Defective mutations which alter a late step, seem to be located on another region, close to the  $m_5$  and  $g_1$  markers.

5° The study of defective strains brings some information on some steps of phage development, on the mechanism of lysis by phage and on the process of lysogenization.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] APPLEYARD (R. K.). *Genetics*, 1954, **39**, 440.
- [2] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 282.
- [3] WEIGLE (J. J.) et DELBRUCK (M.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 301.
- [4] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 653.
- [5] FUERST (C. R.) et STENT (G. S.). *J. gen. Physiol.*, 1956, **40**, 73.
- [6] GRATIA (A.) et RHODES (B.). *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 1171.
- [7] WOLLMAN (E.) et WOLLMAN (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1932, **49**, 41.
- [8] MAXTED (W. R.). *J. gen. Microb.*, 1957, **16**, 584.



- [9] SERTIC (V.) et BOULGAKOV (N. A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 734.
- [10] ANDERSON (T. F.). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1945, **25**, 17.
- [11] PANIJEL (J.) et HUPPERT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 619.
- [12] HUPPERT (J.) et PANIJEL (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 711.
- [13] SALTON (M. R. J.). *Nature*, 1952, **170**, 746.
- [14] TOMCSIK (J.) et GUEX HOLZER (S.). *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.*, 1952, **15**, 517.
- [15] WEIBULL (C.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 688.
- [16] REPASKE (R.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **22**, 189.
- [17] ZINDER (N. D.) et ARNDT (W. F.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1956, **42**, 586.
- [18] JACOB (F.) et FUERST (C. R.). In *Symposium of the Society for general Microbiology on bacterial lysis*, 1957 (*sous presse*).
- [19] LURIA (S. E.). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 463.
- [20] DE MARS (R. I.). *Virology*, 1955, **1**, 83.
- [21] NOVICK (A.) et SZILARD (L.). *Science*, 1951, **113**, 34.
- [22] APPELYARD (R. K.), MCGREGOR (J. F.) et BAIRD (K. M.). *Virology*, 1956, **2**, 565.
- [23] HERSHEY (A. D.). In *Mutations, Brookhaven Symposium in Biology*, 1956, **8**, 6.
- [24] LURIA (S. E.). *Genetics*, 1945, **30**, 84.
- [25] APPELYARD (R. K.). *J. gen. Microb.*, 1956, **14**, 573.
- [26] JACOB (F.). *Les bactéries lysogènes et la notion de provirus*, Masson éd., Paris, 1954.
- [27] FRY (B.). *J. gen. Microb.* (*sous presse*).
- [28] ARBER (W.) et KELLENBERGER (G.). [*sous presse*].
- [29] JACOB (F.) et WOLLMAN (E. L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 486.
- [30] BARRINGTON (L. F.) et KOZLOFF (L. M.). *J. biol. Chem.*, 1956, **223**, 615.
- [31] WEIDEL (W.). In *Symposium of the Society for General Microbiology on bacterial lysis*, 1957 (*sous presse*).
- [32] HERSHEY (A. D.) et MELECHEN (N. E.). *Virology*, 1957, **3**, 207.
- [33] ARBER (W.), KELLENBERGER (G.) et WEIGLE (J. J.) [*sous presse*].

## ERRATUM

Dans le tableau II, colonne P16, au lieu de  $1,8 \times 10^3$ , lire  $1,8 \times 10^8$  bactéries/ml.

# LA RÉACTIVATION MULTIPLE HOMOLOGUE ET HÉTÉROLOGUE DU BACTÉRIOPHAGE INACTIVÉ PAR VOIE PHYSIQUE ET CHIMIQUE

(DEUXIÈME PARTIE).

par W. MUTSAARS (\*).

(Université libre de Bruxelles,  
Faculté de Médecine et de Pharmacie,  
Laboratoire de Bactériologie)

Cette communication n'étant que le prolongement d'un mémoire antérieur [4] nous renvoyons à celui-ci pour les détails techniques et limitons cet exposé à la relation de quelques recherches complémentaires.

## A. — RÉACTIVATION MULTIPLE HOMOLOGUE.

*Expérience I.* — Il s'agit en l'occurrence de la réactivation qui s'observe dans des mélanges en proportions adéquates de Coli W sensible (1) et de bactériophage  $\phi$  N formolé. L'étude de la réactivation multiple hétérologue, obtenue par mélange au Coli W sensible de proportions adéquates de  $\phi$  N formolé et de  $\phi$  N traité par les radiations ultra-violettes, nous a montré que cette réactivation est conditionnée par la réunion simultanée, dans un même récipient, du *B. coli* et des deux lots de phage. La réunion, après fixation du phage, des deux lots primitivement séparés, l'un de Coli et de phage formolé, l'autre de Coli et de phage irradié, ne donne lieu à aucune réactivation (voir I, exp. 2, tableau IV).

Comme nous le verrons, il en est de même en ce qui concerne la réactivation multiple homologue.

Le bactériophage  $\phi$  N provenant d'un stock titrant  $10^{10}$  particules au millilitre, nous l'avons utilisé, après traitement par le

(\*) Manuscrit reçu le 12 juillet 1957.

(1) Le Coli W ne doit pas être confondu avec la souche *E. coli* « strain W » utilisée par certains auteurs américains, par exemple Barner et Cohen [5].

formol, à la dilution  $10^{-3}$ . Cette dilution est distribuée à raison de 5 ml par tube dans 9 grands tubes à essais. Deux de ces tubes, témoins, reçoivent 2,5 ml de bouillon BHI faible. On les porte au bain-marie à  $38^{\circ}$  et, après réchauffement, l'un de ces tubes reçoit 2,5 ml de culture de Coli W, âgée de 5 heures, non diluée, l'autre reçoit 2,5 ml de cette même culture, mais diluée à  $10^{-2}$  en bouillon BHI faible. Ces mélanges, après séjour de six minutes au bain-marie, sont tous deux distribués dans 5 tubes,

TABEAU I.

	1	2	3	4	5
0 m.	215 (19)	90 (11)	240 (12,3)	235 (19,9)	205 (36,4)
1 m.	450 (90,7)	130 (24)	315 (41,7)	315 (30,6)	335 (36,6)
2 m.	605 (127)	165 (33)	295 (25,3)	270 (17,6)	320 (36,4)
3 m.	480 (46,9)	145 (10,2)	400 (25)	330 (40,2)	295 (36)
4 m.	715 (102)	185 (16,4)	400 (30,6)	390 (40,3)	395 (10)
5 m.	695 (111)	250 (28,4)	700 (197)	390 (47)	495 (60,2)
6 m.	1050 (119)	440 (105)	745 (121)	640 (92)	650 (41,9)
Tém. Coli non dilué	170 (104)	60 (2,9)	165 (14,3)	160 (15)	170 (10,8)
Tém. Coli dil. $10^{-2}$	815 (19,9)	1835 (433)	1590 (62,8)	2725 (366)	1935 (488)
F Test	29,63	22,09	23,9	31,32	57,9

Les premiers chiffres dans chaque case représentent la moyenne arithmétique de la somme des plages de bactériophagie comptées sur 5 boîtes de Petri. Les chiffres entre parenthèses donnent la déviation moyenne. Ces remarques s'appliquent également aux tableaux II, III, IV.

à raison de 0,9 ml par tube. Chacun de ces tubes reçoit un tube de gélose à 0,6 p. 100, maintenue liquide par séjour dans un bain-marie à  $55^{\circ}$ ; le tout est ensuite coulé dans une boîte de Petri contenant déjà de la gélose de base à 2 p. 100. Les mélanges comprenant du Coli à la dilution  $10^{-2}$  reçoivent de la gélose contenant 0,5 ml de Coli non dilué.

Les 7 tubes expérimentaux reçoivent tous à la minute 0 un volume de 2,5 ml de culture de Coli W diluée à  $10^{-2}$ , et ensuite mais à des temps s'échelonnant entre zéro et six minutes, 2,5 ml de culture de Coli W non diluée. Ces tubes ne diffèrent donc entre eux que par le temps de contact entre la masse de bact-

riophage formolé et la culture de Coli W diluée à  $10^{-2}$ . Il est évident que si le nombre de plages de bactériophagie est fonction de la probabilité de fixation de deux ou plusieurs particules formolées sur le même germe, ce nombre doit augmenter à mesure que le contact entre les particules et la faible quantité de germes se prolonge. Le tableau I donne les résultats de cinq expériences.

Le test de Fisher, pour  $P = 0,01$  ; 6 degrés de liberté pour la variance entre les groupes et 28 degrés de liberté de la variance à l'intérieur des groupes, vaut 3,53. Les valeurs calculées dépassent largement ce chiffre : l'influence du moment d'addition du Coli non dilué au phage sur le nombre de plages de bactériophagie est donc certaine.

*Expérience II.* — Nous avons étudié l'influence de la teneur en germes dans un mélange où la teneur en phage reste constante, sur le nombre de plages de bactériophagie, et ceci de façon plus approfondie.

Nous distribuons, à raison de 5 ml par tube, du phage formolé, dilué  $5.10^{-3}$ , dans 9 tubes. Ces tubes sont conservés dans un bain de glace fondante et réchauffés dans le bain-marie à  $38^{\circ}$  à mesure de leur emploi. On conserve et on traite de même une série de 9 tubes également, contenant, à raison de 5 ml par tube, du Coli W en dilutions variables, depuis le tube 1 qui contient du Coli W non dilué provenant d'une culture âgée de 5 heures, jusqu'au tube 9 qui contient ce même Coli, mais à la dilution  $2,5.10^{-3}$  (voir tableau II). Après réchauffement séparé du tube de phage et du tube de Coli, on les mélange et on titre ce mélange après séjour de dix minutes à  $38^{\circ}$ .

Chaque expérience s'accompagne d'une numération du Coli W (titrage fait à la dilution  $10^{-6}$ ) et d'un titrage du  $\phi$  N non formolé (titrage fait à la dilution  $10^{-7}$ ). Les valeurs calculées pour le test de Fisher sont très élevées, la valeur normale correspondant aux degrés de liberté envisagés étant de 3,53 pour une probabilité  $P = 0,01$  p. 100.

Il existe également une corrélation négative satisfaisante entre le nombre de germes et le nombre de plages, ainsi qu'en témoignent les indices de corrélation calculés. Il existe cependant une limite à l'augmentation du nombre de plages en fonction de la diminution du nombre de germes. Cette limite est atteinte avec la dilution  $2,5.10^{-3}$  de *E. coli*, et, dans certains cas, une plus grande dilution des germes entraîne une diminution du nombre de plages (voir exp. IV et V), de sorte que l'indice de corrélation partiel, c'est-à-dire calculé d'après les quatre plus fortes dilutions des germes, devient positif : +0,067 pour l'expérience IV, +0,97 pour l'expérience V. Le test T a été appliqué à ces cinq essais,

avec une sécurité statistique de 99 p. 100. A côté de chaque moyenne (voir tableau II) un signe + indique que cette moyenne diffère de façon significative de la moyenne précédente, un signe — indique une différence non significative. C'est ainsi que les moyennes du rang 2 (Coli dilué  $5.10^{-1}$ ) ne diffèrent pas signifi-

TABLEAU II.

		1	2	3	4	5
1	Coli non dilué	42 (5,6)	195 (6,7)	100 (9,2)	165 (9,8)	110 (3,4)
2	Dilut. $5 \cdot 10^{-1}$	80 (2,5) —	320 (23) —	155 (21) —	170 (13) —	225 (13) —
3	$2,5 \cdot 10^{-1}$	200 (24) +	795 (28) +	500 (75) +	325 (20) —	575 (63) —
4	$10^{-1}$	420 (38) +	1300 (130) +	1225 (184) +	745 (35) +	1095 (71) +
5	$5 \cdot 10^{-2}$	715 (25) +	1460 (152) —	1000 (50) —	1150 (77) +	1335 (86) —
6	$2,5 \cdot 10^{-2}$	605 (36,5) —	1285 (161) —	1210 (60) —	2040 (238) —	2210 (327) +
7	$10^{-2}$	930 (56) —	1585 (228) —	1305 (100) —	2150 (252) —	1875 (128) —
8	$5 \cdot 10^{-3}$	600 (62) —	1440 (170) —	1300 (120) —	1715 (87) —	1805 (248) —
9	$2,5 \cdot 10^{-3}$	775 (94) —	1905 (222) —	1460 (142) —	1410 (141) —	1475 (317) —
	Coli utilisé à $\times 10^6$	665 (17)	355 (18,6)	560 (10)	1050 (13)	470 (5,7)
	N non formolé à $\times 10^7$	455 (7)	480 (5,5)	480 (18)	435 (6,6)	500 (7,5)
	F test	188	56,4	103	125	69
	R =	0,874	0,877	0,92	0,75	0,73

cativement de celle du rang 1 ; viennent ensuite en général une série de différences suffisantes, qui cessent de l'être quand le rapport particules/germes atteint un certain niveau. Ce niveau varie de 0,4 à 0,8 selon les essais.

*Expérience III.* — En présence d'une quantité constante de phage formolé, la réduction du nombre de germes entraîne donc,



jusqu'à une limite, une augmentation du nombre de plages de bactériophagie.

Inversement, en présence d'une quantité constante de germes, l'augmentation du nombre de particules de phage formolé détermine, elle aussi, une augmentation du nombre de plages, qui dépasse celle à laquelle on pourrait normalement s'attendre, s'il n'y avait réactivation.

Sept tubes contiennent, à raison de 5 ml, des dilutions de phage formolé allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  (voir tableau III). Sept autres tubes

TABLEAU III.

	Dilution du phage formolé	1	2	3
1	$10^{-1}$	5030 (5:245)	3265 (5:212)	3310 (5:240)
2	$5 \cdot 10^{-2}$	2130 (4260) (5:124)	1155 (2390) (5:51)	1645 (3290) (5:104)
3	$2,5 \cdot 10^{-2}$	935 (3740) (5:84)	480 (1920) (5:14)	675 (2700) (5:30)
4	$10^{-2}$	250 (2500) (5:14)	220 (2200) (5:29)	165 (1650) (5:18)
4 bis	$10^{-2}$	1380 (5:146)	780 (5:163)	1300 (5:107)
5	$5 \cdot 10^{-3}$	110 (2200) (5:13)	108 (2160) (5:12)	80 (1600) (5:6)
6	$2,5 \cdot 10^{-3}$	54 (2260) (5:3)	55 (2200) (5:6)	45 (1800)
7	$10^{-3}$	23 (2300)	96,8 (1680)	15,6
	Titrage Coli à $\times 10^6$ /ml.	960 (5:24)	835 (5:13)	800
	Titrage N non formolé à $10^7$ /ml.	485 (5:14,8)	440 (5:9,5)	390
	Indice de corrélation	0,947	0,89	0,903
	F test	107	134	72

contiennent chacun 5 ml d'une culture jeune de Coli W. Ces tubes sont conservés dans la glace et réchauffés comme dans l'expérience précédente, et les titrages se font également de la

même façon. A chaque expérience est joint un titrage du Coli W utilisé et un titrage du  $\phi$  N non formolé.

Le tableau III donne les résultats de trois expériences. Les numérations doivent, bien entendu, être multipliées par le taux de dilution pour être comparables. Ces chiffres sont indiqués entre parenthèses. Un titrage de bactériophage normal donnerait, dans ces conditions, des numérations à peu près égales, et même une diminution du nombre de plages en fonction de l'augmentation du nombre de particules, un germe polyinfecté ou infecté par une particule étant tous deux à l'origine d'une seule plage. En utilisant du bactériophage formolé on constate que le nombre de plages dépasse celui qui devrait être obtenu normalement, s'il n'y avait pas réactivation multiple. Il existe un indice de corrélation très satisfaisant entre l'élévation de la concentration du phage formolé et l'augmentation du nombre de plages. Il va sans dire que cet indice a été calculé après avoir multiplié le nombre de plages de bactériophagie par la dilution correspondante. A partir de la dilution  $10^{-2}$  on observe que les chiffres corrigés deviennent constants. A cette dilution la presque totalité des germes infectés le sont vraisemblablement par une seule particule ; à ce moment le rapport particules/germes est d'environ 0,05 (rangée 4). Mais si l'on fait passer ce rapport à 5, en utilisant une culture de Coli W diluée à  $10^{-2}$  au lieu d'une culture non diluée, le nombre de plages augmente considérablement (rangée 4 bis).

*Expérience IV.* — La plupart des expériences de réactivation homologue ont été faites en comparant le nombre des plages obtenues dans des mélanges où la quantité de phage formolé est constante, mais où l'on fait varier le nombre de germes en utilisant soit une culture non diluée, soit cette culture diluée à  $10^{-2}$  dans du bouillon frais. Dans le but d'éliminer l'influence éventuelle de ce bouillon frais par rapport au bouillon de la culture non diluée, nous avons fait quelques essais de contrôle.

Une culture de Coli W âgée de 5 à 6 heures est divisée en deux lots, l'un étant conservé tel quel, l'autre étant centrifugé. Le culot de centrifugation est lavé et finalement resuspendu dans un volume de bouillon neuf égal au volume primitif. A partir de ces deux lots dits non dilués on procède à des dilutions à  $10^{-2}$  en bouillon neuf. Des volumes de 5 ml de chacune des quatre suspensions microbiennes ainsi obtenues sont mis au contact de volumes égaux de phage formolé dilué à  $10^{-3}$ . Les mélanges séjournent dix minutes à  $38^{\circ}$  et sont ensuite soumis au titrage. Il est fait une numération des suspensions de Coli utilisées et un titrage du phage non formolé. L'examen du tableau IV montre que les cultures non diluées, qu'elles soient centrifugées ou non,

TABLEAU IV.

	1	2	3	4
Nombre de plages avec culture centrifugée non diluée	85	87	3,2	10
Nombre de plages avec culture non centrifugée non diluée	50	75	1,2	14
Nombre de plages avec culture centrifugée diluée $10^{-2}$	720	1030	23	65
Nombre de plages avec culture non centrifugée diluée $10^2$	485	1050	27	87
Culture centrifugée numération Coli à $\times 10^8$	1,2	4,9	3	6,4
Culture non centrifugée numération Coli à $\times 10^8$	3,5	6,2	4,4	8,2
Numération $\varphi$ N non formolé à $\times 10^9$	-	9,3	4	4

ont un rendement à peu près égal, quand on les mélange au phage formolé. Le remplacement du bouillon primitif par du bouillon frais n'exerce donc aucune influence sur le rendement en plages. Celui-ci n'est influencé que par le rapport particules/germes.

#### B. — RÉACTIVATION MULTIPLE HÉTÉROLOGUE.

Nous rappelons que nous avons ainsi désigné les réactivations dues à la coopération de particules de phage formolées et de particules irradiées par les radiations ultra-violettes.

R. A. C. Foster [2] a isolé, à partir des phages T4 et T6, des mutants résistants à la trypaflavine. Nous avons eu l'occasion d'isoler à partir du phage  $\varphi$  N un mutant analogue [3, 4], mutant que nous avons appelé  $\varphi$  T. Grâce à ce mutant, il nous a été possible d'obtenir des réactivations multiples hétérologues homogènes et hétérogènes. Une réactivation multiple hétérologue homogène est celle obtenue par la coopération de particules formolées et irradiées issues d'un même type de phage, selon le schéma ( $\varphi$  N form.  $\varphi$  N irr.) ou ( $\varphi$  T form.  $\varphi$  T irr.). La réactivation multiple hétérologue hétérogène est celle obtenue par la coopération de particules issues des deux types de phage  $\varphi$  N et  $\varphi$  T selon le schéma ( $\varphi$  N form.  $\varphi$  T irr.) ou ( $\varphi$  T form.  $\varphi$  N irr.). Nous avons suivi le comportement de ces diverses réactions en milieu trypaflaviné et en gélose ordinaire.

*Expérience V.* — Rendement en milieu trypaflaviné des quatre types de réactivation.

Le phage  $\phi$  T avait subi 33 passages en bouillon trypaflaviné. Nous lui avons fait subir 3 passages en bouillon ordinaire, le dernier passage constituant le stock destiné à ces essais. A ce moment un titrage est fait en gélose ordinaire et en gélose trypaflavinée (gélose ordinaire additionnée de 4 ml d'une solution à 0,05 p. 100 de trypaflavine par litre). Ce titrage donne, sur gélose ordinaire, un titre de  $3,8 \cdot 10^9$  et sur gélose trypaflavinée  $3 \cdot 10^9$ . Un stock de  $\phi$  N titre sur gélose ordinaire  $1,2 \cdot 10^9$  et sur gélose trypaflavinée  $2,6 \cdot 10^7$ . Le titre du  $\phi$  N sur gélose trypaflavinée est bien plus élevé que celui obtenu lors de nos essais précédents [3, 4], le  $\phi$  N ne donnant à ce moment que quelques plages à la dilution  $10^{-1}$  en milieu trypaflaviné. Nous utilisons actuellement un milieu à base de Brain Heart Infusion (Difco); ce milieu est plus riche que celui utilisé antérieurement et contient des substances qui neutralisent une partie de l'effet antiphage de la trypaflavine. En possession de ces deux stocks de phage, nous avons obtenu, par formolisation et par irradiation, quatre variétés, à savoir le  $\phi$  N formolé, le  $\phi$  N irradié, le  $\phi$  T formolé et le  $\phi$  T irradié. Les mélanges suivants ont été préparés :

TUBE 1 : 2,5 ml de  $\phi$  T form. dilué à  $10^{-2}$  dans du bouillon contenant de la trypaflavine à quadruple concentration + 2,5 ml de  $\phi$  N irradié non dilué.

TUBE 2 : 2,5 ml de  $\phi$  T form. dilué à  $10^{-2}$  en bouillon trypaflaviné à quadruple concentration + 2,5 ml de  $\phi$  T irradié non dilué.

TUBE 3 : 2,5 ml de  $\phi$  N form. dilué à  $10^{-3}$  dans du bouillon trypaflaviné à quadruple concentration + 2,5 ml de  $\phi$  T irradié non dilué.

TUBE 4 : 2,5 ml de  $\phi$  N form. dilué à  $10^{-2}$  en bouillon trypaflaviné à quadruple concentration + 2,5 ml de  $\phi$  N irradié non dilué.

Nous ajoutons les témoins suivants :

TUBE 5 : 2,5 ml de  $\phi$  T form. dilué à  $10^{-2}$  en bouillon trypaflaviné à quadruple concentration + 2,5 ml de bouillon.

TUBE 6 : 2,5 ml de  $\phi$  T irradié non dilué + 2,5 ml de bouillon trypaflaviné à quadruple concentration.

TUBE 7 : 2,5 ml de  $\phi$  N form. dilué à  $10^{-2}$  en bouillon trypaflaviné à quadruple concentration + 2,5 ml de bouillon.

TUBE 8 : 2,5 ml de  $\phi$  N irradié non dilué + 2,5 ml de bouillon trypaflaviné à quadruple concentration.

Chaque tube reçoit 5 ml d'une culture de Coli W âgée de 5 à 6 heures, ce qui a pour effet de ramener la teneur en trypaflavine du mélange à son taux normal ; les mélanges séjournent





Au contraire, l'emploi de particules  $\varphi$  T donne un nombre de plages important.

L'examen des réactivations hétérologues hétérogènes nous montre que seule la combinaison  $\varphi$  T form. +  $\varphi$  N irradié donne un rendement favorable, la combinaison inverse donnant un résultat très médiocre bien que supérieur à la combinaison de deux particules  $\varphi$  N. En milieu trypaflaviné, le facteur décisif réside donc dans la nature de la particule formolée. S'il s'agit d'une particule  $\varphi$  T, la combinaison avec une particule irradiée sera féconde, même si celle-ci est du  $\varphi$  N.

*Expérience VI.* — Cette expérience ne diffère de la précédente que par l'emploi de milieux liquides et solides ordinaires, non

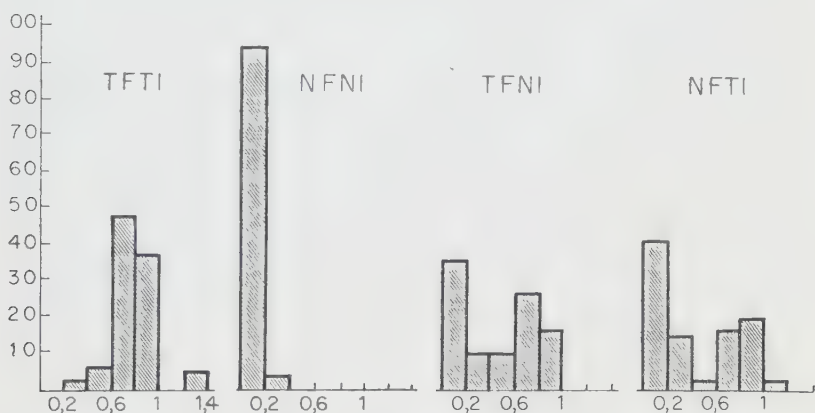


FIG. 1.

trypaflavinés. On observe, cela va sans dire, des réactivations satisfaisantes quelle que soit la combinaison de particules envisagée (voir tableau V).

A partir des boîtes de Petri de chacun des quatre mélanges nous avons isolé au fil de platine et repiqué en bouillon ordinaire 40 plages de bactériophagie, à savoir : 40 plages issues du mélange  $\varphi$  T form. +  $\varphi$  N irr. ; 40 plages issues du mélange  $\varphi$  T form. +  $\varphi$  T irr. ; 40 plages issues du mélange  $\varphi$  N form. +  $\varphi$  T irr. ; enfin 40 plages issues du mélange  $\varphi$  N form. +  $\varphi$  N irr. Nous avons titré ces 160 tubes de bactériophagie, simultanément sur gélose ordinaire et sur gélose trypaflavinée. Vu leur ampleur, ces titrages n'ont été faits que sur une seule boîte de Petri, et non pas en quintuple exemplaires. Les numérations ont été faites à des dilutions à  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ . Pour simplifier, nous ne donnons pas ces numérations, mais bien le rapport entre le

nombre de plages sur gélose trypaflavinée et celui sur gélose ordinaire. Les quotients ainsi obtenus vont de 0 (aucune plaque sur gélose trypaflavinée, donc phage sensible à la trypaflavine) à 1 (nombre égal de plages sur gélose trypaflavinée et gélose ordinaire, donc phage résistant à la trypaflavine). Dans certains cas rares, le rapport peut même dépasser l'unité. L'examen du tableau VI et de l'histogramme (fig. 1) établi d'après ces données révèle que les  $2 \times 40$  repiquages à partir des réactivations homogènes ( $\varphi$  T form. +  $\varphi$  T irr. ;  $\varphi$  N form. +  $\varphi$  N irr.) sont extraits de populations également homogènes.

Une de ces populations est constituée de particules sensibles à la trypaflavine (mode entre 0 et 0,2), l'autre de particules capables de se développer en milieu trypaflaviné (mode entre 0,8 et 1). Les 40 repiquages ( $\varphi$  T form. +  $\varphi$  N irr.) et les 40 repiquages ( $\varphi$  N form. +  $\varphi$  T irr.) proviennent manifestement d'une population de plages qui constitue un mélange de plages sensibles et de plages résistantes à la trypaflavine. Les histogrammes présentent deux sommets. La réactivation hétérologue hétérogène, quand elle se déroule dans un milieu indifférent, donne donc naissance soit à du phage sensible, soit à du phage résistant, cette sensibilité et cette résistance étant du même ordre de grandeur que celles des particules parentes. Il ne paraît donc pas se former d'« hybrides » à résistance intermédiaire, ou tout au moins leur nombre est-il restreint par rapport aux particules filles très sensibles ou très résistantes.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

I. Le nombre de plages obtenu au cours de la réactivation multiple homologue du page  $\varphi$  N formolé dépend du rapport particules/germes.

1° La diminution de ce rapport par l'adjonction, au cours de la fixation du phage, de quantités supplémentaires de germes diminue le nombre de plages.

2° Des modifications de ce rapport par variation du nombre de germes montre qu'il existe une corrélation négative entre le nombre de plages et le nombre de germes.

3° Des modifications de ce rapport par variation du nombre de particules de phage montrent qu'il existe une corrélation positive entre le nombre de plages et le nombre de particules.

II. 1° En milieu trypaflaviné favorable au mutant  $\varphi$  T, le rendement en plages dans des mélanges hétérologues hétérogènes dépend de la qualité de la particule formolée. Il est élevé si cette particule est  $\varphi$  T, quelle que soit la qualité de la particule parentaire irradiée.

2° En milieu ordinaire, la réactivation hétérologue hétérogène donne naissance à des populations mixtes, formées d'individus soit sensibles, soit résistants à la trypaflavine. Il ne se forme pas d'hybrides.

## SUMMARY

HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS MULTIPLICITY REACTIVATION OF THE BACTERIOPHAGE INACTIVATED BY PHYSICAL AND CHEMICAL AGENTS.

I. Mutual reactivation of formaldehyde inactivated particles depends on the particle/germ ratio. Any process lowering this ratio reduces the number of plaques.

II. A mutant of phage  $\phi$ N, phage  $\phi$ T, has been used for these experiments. This phage multiplies in a trypaflavine containing medium. In this medium, a good yield of plaques has been obtained both in mixtures of formaldehyde inactivated  $\phi$ T particles and ultraviolet light inactivated  $\phi$ T particles, and in mixtures of formaldehyde inactivated  $\phi$ T particles and ultraviolet light inactivated  $\phi$ N particles.

The yield is almost negligible, however, in mixtures of formaldehyde inactivated  $\phi$ N particles and ultraviolet light inactivated  $\phi$ T particles, and, of course, in mixtures where both formaldehyde and ultraviolet light inactivated particles are  $\phi$ N.

The yield in plaques is decisively influenced by the nature of the formaldehyde inactivated particle.

Forty specimens of phage were obtained from single plaques developing in ordinary media, after reactivation experiments involving the following mixtures: A.  $\phi$ T form. +  $\phi$ T irr.; B.  $\phi$ T form. +  $\phi$ N irr.; C.  $\phi$ N form. +  $\phi$ N irr.; D.  $\phi$ N form. +  $\phi$ T irr.

The 160 specimens of phage were tested on ordinary and on trypaflavine media. Only trypaflavine resistant phage was found in phages from mixture A, only trypaflavine sensitive phage from mixture C. In phage from mixtures B and D both sensitive and resistant strains were found in approximately equal proportions. Apparently no intermediate hybrid strains are formed.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 1.
- [2] FOSTER (R. A. C.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 795.
- [3] MUTSAARS (W.). *Nature*, 1950, **165**, 397.
- [4] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 65.
- [5] BARNER et COHEN. *J. Bact.*, 1954, **63**, 80.

# EFFET DES PRODUITS D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU SÉRUM DE POULAIN SUR LA CROISSANCE DES CELLULES DE LA SOUCHE HELA

par Ph. DANIEL, P. SLIZEWICZ et P. LÉPINE (\*).

(Institut Pasteur, Service des Virus [D<sup>r</sup> P. LÉPINE])

## INTRODUCTION.

Il n'a pas encore été possible, même avec les milieux synthétiques les plus complexes, de se passer du sérum dans les cultures *in vitro*, exception faite pour certaines lignées cellulaires de la souche L de Earle, qui peuvent survivre et se multiplier dans un milieu purement synthétique (Evans [1]) ou semi-synthétique (Waymouth [2]).

Carrel et Ebeling [3], ainsi que de nombreux auteurs à leur suite, ont montré que le sérum conserve ses propriétés même après dialyse prolongée. L'ultracentrifugation permet de reconnaître que le principe actif est lié à la fraction macromoléculaire (Barski, Maurin, Wielgosz et Lépine [4]).

Quelques chercheurs, dont Carrel, ont même pu attribuer à certaines fractions protéiques du sérum la totalité ou une partie du pouvoir de croissance [5, 6, 7, 8, 9].

Aujourd'hui on peut dire avec certitude que le sérum apporte des facteurs essentiels non dialysables, liés aux protéines précipitables par le sulfate d'ammonium et l'alcool à basse température, et qu'on peut sédimenter par ultracentrifugation. Ces facteurs sont également thermolabiles.

L'idée que les facteurs de croissance ne sont pas les protéines dans leur partie holoprotéique, mais des groupements actifs qui sont transportés par celles-ci, a été souvent émise (Barski et coll. [4], Eagle [10]) avec d'autant plus de vraisemblance que de nombreuses substances essentielles pour un organisme (hormones, vitamines) sont véhiculées de cette manière.

C'est pour vérifier cette hypothèse que nous avons hydrolysé

(\*) Manuscrit reçu le 22 juillet 1957.

du sérum par la trypsine d'une manière aussi peu traumatisante que possible, et étudié à l'aide des cellules de la souche HeLa l'action sur la survie.

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1° Les cellules provenaient de la souche HeLa régulièrement entretenue sur le milieu à l'hydrolysate de caséine déjà décrit [11].

Les cultures étaient employées cinq à six jours après leur ensemencement dans des tubes en pyrex, ou dans des tubes à lamelles.

2° Le milieu de base dans lequel étaient testés les produits d'hydrolyse du sérum était constitué du milieu à l'hydrolysate de caséine, complété par l'adjonction des vitamines suivantes :  $\alpha$ -tocophérol (1 mg/l), vitamine A (0,01 mg/l), calciférol (0,1 mg/l), B<sub>12</sub> (0,01  $\mu$ g/l), méso-inositol (1 mg/l), hypoxanthine (10 mg/l), ménadione (0,01 mg/l).

Ces facteurs, peut-être inutiles pour la plupart, furent employés pour limiter au minimum les risques de carence.

3° La trypsine employée, d'activité 1/300, provenait de la maison Mann.

#### 4° Hydrolyse du sérum.

Nous avons utilisé du sérum de poulain, apte à la culture de la souche HeLa, auquel nous avons ajouté 20 g de trypsine en poudre pour 1 000 cm<sup>3</sup> de sérum selon la technique décrite par Blass, Macheboeuf, Springell et Tayeau [12], mais en omettant d'ajouter du nitrate de calcium et du cyanure de potassium.

Après filtration stérilisante, le sérum contenant la trypsine dissoute était incubé à 37° C pendant dix jours. Dans ces conditions, les 4/5 des protéines précipitables par l'acide trichloracétique sont hydrolysés et il se forme un précipité blanchâtre de nature lipidique, dont l'importance croît avec le degré d'hydrolyse.

Ce précipité a été mis à part (fraction I), et le surnageant dialysé contre de l'eau bidistillée pendant quatre jours. Le dialysat obtenu a été isotomisé avec une solution concentrée de Earle (fraction II).

L'hydrolysate restant dans le sac de dialyse était traité par du sulfate d'ammonium à saturation. Le précipité formé était éliminé et le surnageant dialysé contre de l'eau bidistillée jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium. En dernier lieu, le surnageant était dialysé contre la solution de Earle (fraction III).

Nous avons obtenu ainsi trois fractions qui furent testées sur les cellules de la souche HeLa :

a) Un précipité : fraction I ;



b) Un dialysat : fraction II ;

c) Une fraction non dialysable : fraction III.

Du sérum, provenant du même lot que celui hydrolysé par la trypsine, fut placé dans les mêmes conditions à 37° C pendant dix jours et servit de contrôle.

#### RÉSULTATS.

Les trois fractions, employées telles quelles, étaient fortement toxiques. Les cultures se nécrosaient en vingt-quatre heures, avec des cellules arrondies surchargées de granulations brunâtres.

Cette toxicité disparaissait par deux extractions successives à l'éther volume à volume. Ce sont donc ces fractions ayant subi deux extractions à l'éther qui ont été employées isolément ou associées.

*La fraction I* est difficile à solubiliser. Seul le mélange alcool-éther à parties égales et à chaud, ou une solution saturée d'urée peuvent le dissoudre.

Pratiquement nous avons employé une solution d'urée à 6 g p. 100 dans l'eau distillée dans laquelle nous avons ajouté 0,1 g 100 de précipité. Dans ces conditions, il y a une bonne dispersion du produit. La suspension obtenue peut ainsi être introduite à raison de 1 p. 100 dans le milieu de base.

Le temps de survie n'est pas amélioré avec ce milieu, dont l'acidification est très rapide. Au contraire, la nécrose est un peu accélérée par rapport aux cultures témoins.

*La fraction II*, employée à la concentration de 20 p. 100 dans le milieu de base, précipite la dégénérescence cellulaire. Après vingt-quatre heures de contact les cellules s'arrondissent. Peu à peu la nécrose fait son apparition pour devenir totale en quatre jours, alors que le témoin constitué par le milieu de base contient une majorité de cellules intactes. Parallèlement à cette dégénérescence accrue, le milieu en expérience s'acidifie plus rapidement que le milieu contrôlé.

*La fraction III* ne contient plus de macromolécule, comme permet de le constater l'ultracentrifugation analytique.

Contrairement aux deux préparations précédentes, la fraction III prolonge nettement la survie, lorsqu'elle est employée à la concentration de 20 p. 100 dans le milieu de base. Comparées aux cultures témoins et à âge égal, les cultures dans ce milieu possèdent moins de cellules arrondies ou nécrosées, tandis que les mitoses sont plus nombreuses (fig. 1 et 2).

Dans certaines de nos expériences le temps de survie a pu ainsi être doublé. Cependant la concentration de la fraction III (trois fois par évaporation) n'améliore pas la qualité du milieu.

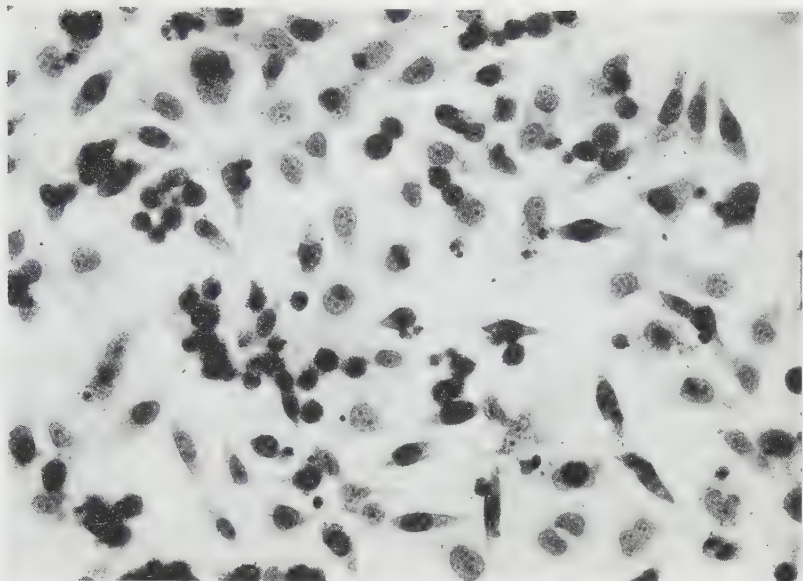


FIG. 1. — Cellules HeLa après six jours de culture dans le milieu de base (gross. : 240 diamètres).

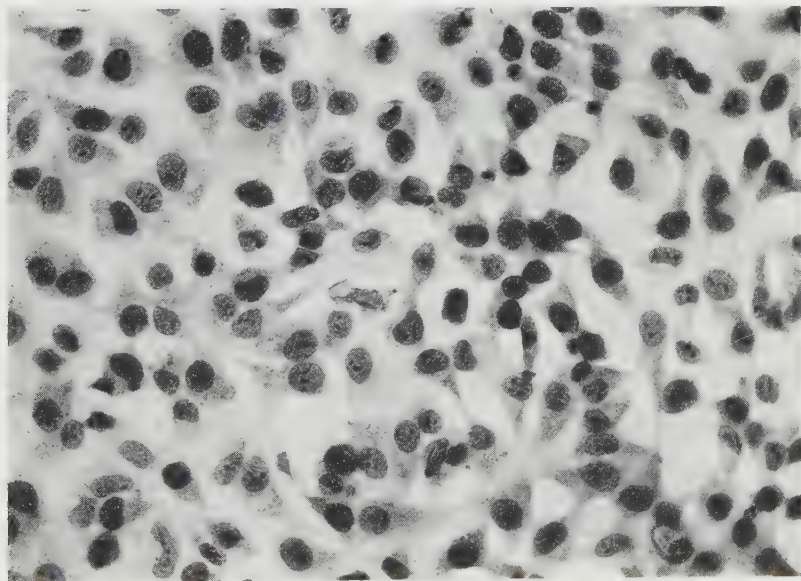


FIG. 2. — Cellules HeLa après six jours de culture dans le milieu de base complété par 20 p. 100 de la fraction III (gross. : 240 diamètres).

La bactopectone Difco, à la concentration de 5 p. 1 000 dans le milieu de base, donne les mêmes résultats favorables.

*Mélange des fractions I, II et III.* — L'association des trois fractions prolonge la survie dans la mesure où la prolonge la fraction III.

Nous avons alors ajouté aux différents milieux préparés à partir des fractions, diverses hormones stéroïdes qui auraient pu être éliminées au cours de l'extraction à l'éther : désoxycorticostérone, propionate de testostérone, œstradiol, progestérone à la dose de 1 mg/l. De même l'insuline ( $10^{-5}$  U. I./l) et la vasopressine (20 U. I./l), qui sont détruites par la trypsine, ont été essayées comme compléments des milieux testés. Les hormones n'ont pas amélioré le temps de survie, mais plutôt précipité la dégénérescence cellulaire.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION.

Nous croyons utile de rapporter ces expériences qui donnent des arguments en faveur du rôle indispensable des protéines du sérum, considérées en elles-mêmes, pour le maintien et la croissance des cellules de la souche HeLa, sous réserve toutefois que les extractions à l'éther n'aient pas enlevé quelque principe actif essentiel ou que la trypsine n'ait pas détruit quelque polypeptide indispensable comme il en existe pour la croissance de certains microorganismes.

Cette nécessité des protéines sériques peut s'expliquer par l'incapacité qu'ont les cellules cultivées *in vitro* de synthétiser certaines molécules complexes qui doivent être captées, prêtes à l'emploi, à la manière d'une vitamine.

Cette manière de voir peut prendre appui sur certaines recherches de Francis et Winnick [13] qui ont montré que de grosses molécules protéiques du milieu nutritif sont incorporées directement dans les cellules de l'embryon de poulet en culture.

Mais il devient alors difficile d'expliquer comment de nombreuses espèces cellulaires, cellules de souche ou même cellules de première explantation, peuvent être adaptées à des sérums hétérologues qui permettent de très bonnes croissances.

Ceci amène à penser que l'action du sérum est de nature non spécifique, comme est celle du complément, de la properdine, des facteurs antitrypsiques, etc. Peut-être, comme l'a suggéré Vann [14], les protéines du sérum agissent-elles par leurs propriétés tensio-actives au niveau de la membrane cellulaire, ou par une exaltation de la perméabilité de cette membrane, ou par les deux mécanismes à la fois ? Pour essayer de répondre à ces

questions, il convient de caractériser aussi précisément que possible les protéines responsables de la croissance.

### RÉSUMÉ.

Le sérum de poulain, hydrolysé par la trypsine, perd la propriété d'assurer la survie et la croissance des cellules de la souche HeLa. Seule la fraction non dialysable et qui n'est pas précipitée par le sulfate d'ammonium permet d'augmenter sensiblement le temps de survie par rapport au milieu témoin. L'adjonction de diverses hormones n'améliore pas les résultats.

### SUMMARY

#### THE EFFECT OF ENZYMATIC HYDROLYSIS PRODUCTS OF FOAL SERUM ON THE GROWTH OF HeLa CELLS.

Foal serum, when hydrolysed by trypsin, becomes unable to allow survival and growth of HeLa cells. The non dialysable fraction, which is not precipitated by ammonium sulfate, is alone able to increase the survival time. The addition of different hormones does not modify the results.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] EVANS (V. S.) et coll. *Cancer Res.*, 1956, **16**, 77.
  - [2] WAYMOUTH (C. H.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1956, **17**, 315.
  - [3] CARREL (A.) et EBELING (A. H.). *J. exp. Med.*, 1923, **38**, 419.
  - [4] BARSKI (G.), MAURIN (J.), WIELGOSZ (G.) et LÉPINE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 9.
  - [5] BAKER (L. E.) et CARREL (A.). *J. exp. Med.*, 1926, **45**, 305.
  - [6] JACQUEZ (J. A.) et BARRY (E.). *J. gen. Physiol.*, 1951, **34**, 765.
  - [7] BAZELEY (P. L.), ROTUNDO (R.) et BUSCHECK (E. T.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **87**, 420.
  - [8] SANFORD (K. K.) et coll. *J. nat. Cancer Inst.*, 1955, **16**, 789.
  - [9] MILLIAN (S. J.) et ROBBINS (K. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **91**, 548.
  - [10] EAGLE (H.). *Science*, 1956, **123**, 845.
  - [11] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (PH.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654.
  - [12] BLASS (J.), MACHEBOEUF (M.), SPRINGELL (P.) et TAYEAU (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 588.
  - [13] FRANCIS (M. D.) et WINNICK (T.). *J. biol. Chem.*, 1953, **202**, 273.
  - [14] VANN (L. S.). *Science*, 1956, **123**, 326.
-

# L'ACTION DE LA RIBONUCLÉASE SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA GRIPPE

par J. LE CLERC (\*).

*(Laboratoire de Morphologie Animale, Université de Bruxelles)*

## I. — INTRODUCTION.

L'existence d'un lien entre l'acide ribonucléique (ARN) et la synthèse des protéines résulte de nombreux faits expérimentaux, que Brachet [1, 2] a réunis et discutés récemment.

Basée d'abord sur des observations d'ordre cytochimique, confirmée ensuite par des mesures quantitatives, cette idée a reçu un nouvel appui à la suite d'expériences réalisées au moyen de la ribonucléase [3]. Cet enzyme, qui dégrade spécifiquement l'ARN, pénètre dans de nombreuses cellules vivantes. Il y provoque, d'une façon générale, l'arrêt des synthèses protéiques. Cet arrêt se traduit par le blocage des mitoses dans les œufs d'amphibiens en voie de segmentation [4] et dans les cellules de tumeurs créant une ascite [5], l'arrêt de la croissance des pointes de racines d'oignons [6], l'inhibition de l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines chez les amibes [7].

Puisque l'intégrité de l'ARN paraît indispensable au maintien des synthèses protéiques, on pouvait supposer que la ribonucléase affecterait la multiplication du virus de la grippe. Selon Ada et Perry [8], les propriétés infectieuses de ce virus, qui est dépourvu d'acide désoxyribonucléique, seraient liées à l'ARN.

Deux arguments plaident en faveur de cette hypothèse : la teneur d'une suspension de virus en ARN est proportionnelle au rapport pouvoir infectant/pouvoir hémagglutinant, c'est-à-dire au nombre de particules « complètes » présentes dans la suspension. D'autre part, les différents types sérologiques de virus A et B se distinguent par des ARN de compositions différentes [9]. Il semble donc que les 0,8 p. 100 d'ARN que contient le virus fassent partie intégrante des particules virulentes et soient responsables de la spécificité antigénique et du pouvoir infectieux, comme c'est le cas pour les virus des végétaux.

(\*) Manuscrit reçu le 18 juillet 1957.



Gierer et Schramm [10] et Fraenkel-Conrat et Williams [11] ont clairement montré, en effet, que les propriétés infectieuses du virus de la mosaïque du tabac dépendent de son filament axial, qui est formé d'ARN. En outre, Casterman et Jeener [12, 13] ont constaté que la ribonucléase, lorsqu'elle est infiltrée dans les feuilles de tabac, inhibe la multiplication du virus; elle agit sans doute en dégradant l'ARN, responsable des propriétés génétiques du virus, au moment où celui-ci a pénétré dans la cellule réceptrice.

C'est à la suite de ces travaux que nous nous sommes proposé d'étendre au virus de la grippe les observations de Casterman et Jeener. Nous avons effectivement observé une action inhibitrice de la ribonucléase. Nous avons alors tenté d'éclaircir le mécanisme de cette inhibition en étudiant le moment où agit l'enzyme, l'effet de la ribonucléase sur la cellule-hôte, le métabolisme de l'acide nucléique dans la cellule infectée.

Ajoutons que Barski et Cornefert [14] ont constaté que la ribonucléase réduit de façon importante la synthèse du virus poliomyélitique dans les cultures de cellules rénales de singe. Ce virus est également de nature ribonucléoprotéique.

## II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

*Culture du virus grippal « in vitro »* : La technique utilisée était celle de Tamm, Folkers et Horsfall [15]. La membrane chorioallantoïdienne (MCA) d'embryons de poulets âgés de 12 à 14 jours était découpée en quatre fragments, placés chacun dans 1 ml de solution saline de Hanks. Le virus (souche PR8) était ajouté dans le milieu de culture à la concentration de  $10^2$ - $10^4$  DL50/ml environ. L'incubation des fragments était effectuée à 37° C, en agitant horizontalement les tubes. Le virus a été titré dans le milieu de culture.

*Titrage du virus* : Le pouvoir hémagglutinant a été titré par la méthode de Salk [16] ou celle, plus précise, de Horsfall et Tamm [17]. Le titre a été exprimé par l'inverse de la dilution la plus élevée qui permet d'obtenir une hémagglutination bien visible.

Pour titrer le pouvoir infectant, la suspension était diluée de dix en dix fois et 0,1 ml de chaque dilution était inoculé dans la cavité allantoïque de 4 à 6 embryons de 12 jours. La présence d'hémagglutinine était recherchée au bout de quarante-huit heures d'incubation et le titre calculé par la méthode de Reed et Muench [18].

*Ribonucléase* : Des préparations cristallisées (Armour et G. B. I.) ont été mises en solution directement dans le milieu de culture stérile; elles ont parfois été pasteurisées en solution concentrée dans de l'eau acidifiée à pH 5, par deux chauffages à 80° C, à vingt-quatre heures d'intervalle. L'activité enzymatique de la solution a été vérifiée avant chaque expérience par la méthode de Kunitz [19].

Lorsque ses groupes actifs ont été oxydés, la ribonucléase n'est plus capable de dépolymériser l'ARN; elle constitue alors un précieux

élément de contrôle dans les expériences où l'on s'intéresse à son action enzymatique spécifique [20].

L'enzyme a été oxydé par  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 M, en présence de sulfate ferreux  $10^{-4}$  M ; l'excès d'eau oxygénée était détruit en ajoutant quelques cristaux de catalase.

*Incorporation de la phénylalanine  $^{14}\text{C}$  dans les protéines :* Chaque fragment de membrane chorioallantoïde était placé dans 1 ml de solution de Hanks contenant 2  $\mu\text{C}$  de phénylalanine radioactive. Après une durée d'incorporation déterminée, à 37° C, ils étaient lavés plusieurs fois, puis homogénéisés dans l'acide trichloroacétique (TCA) à 5 p. 100. Le précipité était délipidé à l'alcool-éther ; un aliquot était alors étalé sur un papier filtre, afin de mesurer sa radioactivité. L'azote a été dosé sur un aliquot par la méthode de Kjeldahl, après minéralisation.

La radioactivité est exprimée en coups/minute/10  $\mu\text{g}$  azote.

*Incorporation d'adénine  $^{14}\text{C}$  dans l'ARN :* Des fragments de MCA ont été plongés dans la solution physiologique contenant 2  $\mu\text{C}$  d'adénine radioactive par millilitre. Après une incorporation de durée déterminée, à 37° C, chaque fragment a été lavé soigneusement en présence d'adénine normale, puis homogénéisé dans 1 ml d'éthanol-HCl 0,1 p. 100.

La radioactivité de l'adénine libre et des précurseurs de l'ARN, présents dans la fraction acido-soluble, a été mesurée dans le surnageant évaporé à sec sur une lamelle de verre. Les lamelles ont été éluées dans 0,5 ml d'HCl 0,1 N et les quantités d'ARN correspondantes ont été dosées au spectrophotomètre à 262 m $\mu$ .

Le précipité par l'éthanol-HCl était lavé avec HCl puis délipidé ; l'ARN était alors extrait par 1 ml de TCA 10 p. 100 à 100° C pendant vingt minutes. L'extrait était ensuite débarrassé de l'acide trichloroacétique au moyen d'éther, puis évaporé sur une lamelle de verre, afin de mesurer sa radioactivité. Les lamelles étaient éluées dans 1 ml d'HCl 0,1 N, et l'ARN était dosé au moyen du réactif à l'orcinol [24].

La radioactivité a été exprimée en coups/minute/10  $\mu\text{g}$  ARN.

*Incorporation d'adénine  $^{14}\text{C}$  et d'acide orotique  $^{14}\text{C}$  dans les fragments de MCA :* Le métabolisme de l'ARN a été étudié d'une manière comparative, au moyen de ces deux précurseurs radioactifs, dans la membrane infectée par le virus grippal, en présence ou en l'absence de ribonucléase ; des fragments de MCA non infectés, soumis ou non à l'action de l'enzyme, ont été analysés parallèlement.

On a placé dans chaque tube à essais, contenant 2,5  $\mu\text{C}$  d'adénine et 0,7  $\mu\text{C}$  d'acide orotique dans 1 ml de solution physiologique, un fragment de MCA. Après quinze minutes d'incubation, destinées à élever les valeurs des radioactivités spécifiques, la suspension de virus et la ribonucléase (Armour, 0,4 mg/ml) ont été ajoutées dans les différents tubes. L'incubation était poursuivie à 37° C, en tubes roulants, pendant quinze, trente, soixante et cent vingt minutes. Chaque fragment était alors soigneusement lavé et égoutté sur un papier filtre, puis broyé dans 1 ml d'éthanol-HCl 0,1 p. 100. La centrifugation a permis de séparer la fraction acido-soluble du précipité nucléoprotéique.

*Radioactivité spécifique globale de l'ARN et des précurseurs acido-solubles :* Après avoir délipidé les nucléoprotéides par trois lavages à l'alcool-éther-chloroforme (2/2/1), l'ARN était extrait dans 1 ml

NaOH 0,1 N à 37° C pendant vingt heures. L'acide désoxyribonucléique, extrait en même temps, a été précipité en acidifiant à 0° C par HCl jusqu'à concentration finale 1 N [22].

La radioactivité, mesurée au compteur sur un aliquot de l'extrait, a été rapportée à la quantité correspondante d'ARN mesurée au spectrophotomètre à 260 m $\mu$ .

La fraction acido-soluble (0,5 ml) a été traitée par 3 ml de chloroforme, afin de la débarrasser des lipides et des protéines.

La radioactivité d'un aliquot a été rapportée à la densité optique d'un aliquot équivalent, mesurée au spectrophotomètre à 262 m $\mu$ . Ce rapport exprime la radioactivité spécifique globale des précurseurs puriques et pyrimidiques présents dans la fraction acido-soluble.

*Radioactivité spécifique des purines* : L'extrait acido-soluble et l'extrait ribonucléique ont été chauffés quinze minutes à 100° C, dans HCl N, pour libérer les purines. Celles-ci ont alors été précipitées par Ag<sup>+</sup> en milieu alcalin [23]. Le précipité purique a été centrifugé après une nuit, lavé, puis dissous dans 0,5 ml d'HCl N à 100° C.

La radioactivité spécifique des extraits a été évaluée comme précédemment, en rapportant la radioactivité totale d'un aliquot à la densité optique correspondante, mesurée au maximum d'absorption, c'est-à-dire à 255 m $\mu$ .

### III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

A. ACTION DE LA RIBONUCLÉASE SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS GRIPPAL. — 1° *La ribonucléase est présente dès le moment de l'infection*. — Des fragments de MCA ont été mis en présence de la ribonucléase et du virus grippal simultanément, dans la solution saline de Hanks. Tandis que la quantité d'hémagglutinine libérée dans le milieu augmentait au cours de l'incubation en présence de ribonucléase oxydée, elle est restée constante dans les tubes contenant la ribonucléase active (0,1 mg/ml GBI et 0,6 mg/ml Armour dans les deux expériences représentées par la figure 1). Cependant, la multiplication du virus n'est pas toujours bloquée aussi complètement : la ribonucléase Armour (0,4 mg/ml) n'a exercé, dans l'expérience représentée par la figure 2, qu'une inhibition de 50 p. 100, tant en ce qui concerne le titre infectant que le titre hémagglutinant du virus synthétisé.

Le taux d'inhibition semble dépendre à la fois de la concentration de l'enzyme, de l'échantillon utilisé et de son « vieillissement ». Ledoux et Brachet [24] ont observé aussi des différences marquées dans les effets biologiques exercés sur divers organismes (amibes, pointes de racines d'oignons, cellules du carcinome d'Ehrlich) par différentes préparations commerciales de ribonucléase, même si leurs activités enzymatiques *in vitro* sont équivalentes. D'autre part, le « vieillissement » de la ribonucléase Armour, qui a été étudié par Ledoux [25], s'accompagne de l'apparition progressive de nouvelles fractions protéiques, d'activité

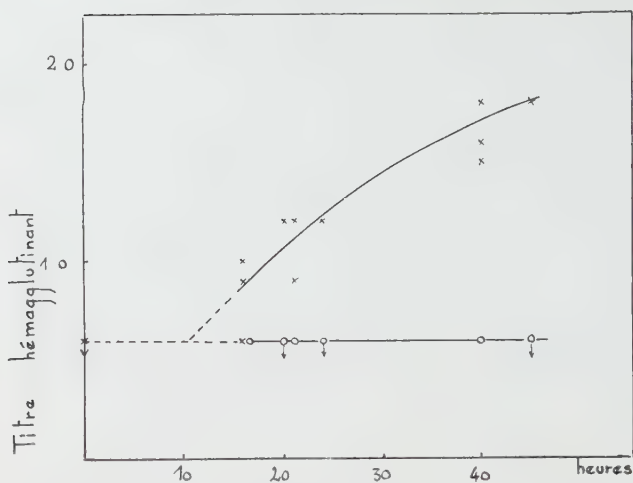


FIG. 1. — Inhibition de la synthèse d'hémagglutinine dans la MCA explantée, en présence de ribonucléase (o). Témoins (x).

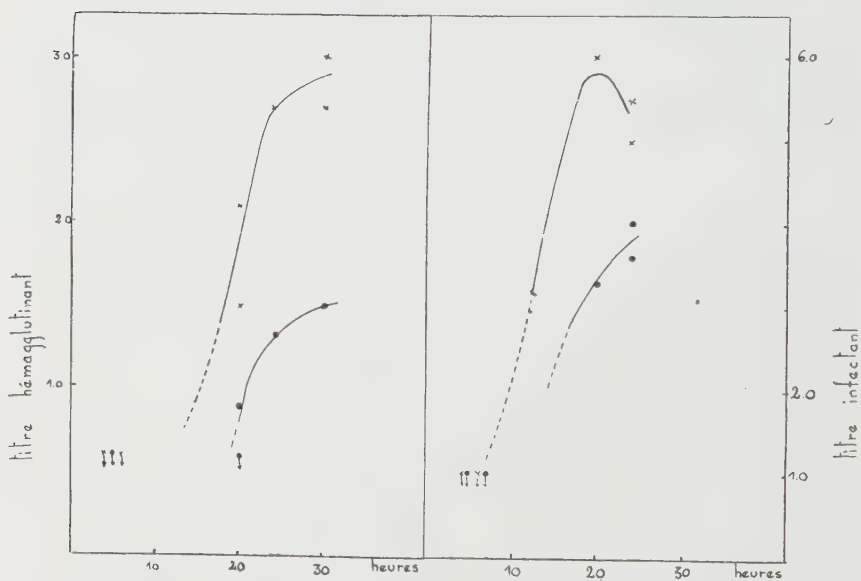


FIG. 2. — Inhibition partielle de la synthèse du virus grippal en présence de ribonucléase (o). Témoins (x).

enzymatique faible, séparables par chromatographie. Il est probable que la présence de ces formes plus ou moins modifiées change le comportement de l'enzyme vis-à-vis des constituants cellulaires et du virus grippal ; on s'explique peut-être ainsi les inhibitions partielles obtenues par Barski et Cornefert [14] sur le virus de la poliomyélite, et par Tamm [26] sur les souches de virus grippal Lee et PR8.

2° La ribonucléase est ajoutée à différents moments du cycle infectieux. — La suspension de virus et 0,1 ml d'une solution de

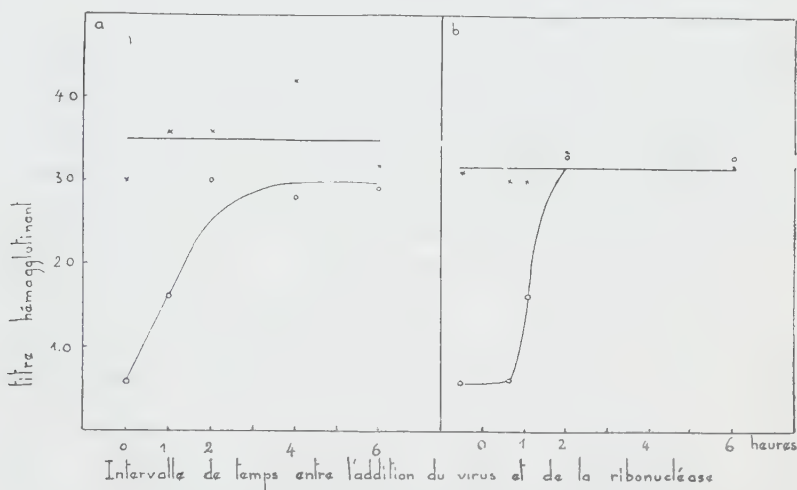


FIG. 3. — Action de la ribonucléase à différents moments du cycle infectieux : a) *in vitro*, b) *in vivo*. Témoins (x). Traités (o).

ribonucléase à 8 mg/ml (Armour) ont été inoculées dans la cavité allantoïque de l'œuf embryonné de 12 jours. Les deux injections ont été faites successivement, par un orifice pratiqué dans la coquille. Après vingt-quatre heures d'incubation à 37° C, la quantité de virus présente dans le liquide allantoïque a été titrée (fig. 3 b).

Le même type d'expérience a été réalisé *in vitro* avec des fragments de MCA, placés dans 1 ml de solution saline ; la ribonucléase (0,5 mg/ml GBI) était ajoutée en même temps ou après le virus. Le pouvoir hémagglutinant du virus présent dans le milieu extérieur était titré au bout de vingt-quatre heures d'incubation (fig. 3 a).

On peut conclure de cette expérience que l'enzyme inhibe la



multiplication du virus, à la condition d'être introduit au cours des deux premières heures qui suivent l'infection.

D'autre part, si le virus et la ribonucléase sont mis au même moment en présence de la MCA, et si le tissu est lavé après une heure d'incubation puis replacé dans 1 ml de solution saline normale, le titre atteint par le virus au bout de vingt-quatre heures est égal à celui trouvé pour les témoins. Le virus peut donc être adsorbé et pénétrer dans les cellules en présence de ribonucléase : c'est donc probablement une phase intracellulaire du développement du virus qui est sensible à l'enzyme.

B. — ACTION DE LA RIBONUCLÉASE SUR LES CELLULES-HÔTES. — Nous avons étudié le métabolisme des cellules de la MCA après le traitement par la ribonucléase, du point de vue de la synthèse du virus, du renouvellement des protéines et de l'ARN. On pouvait supposer, en effet, que l'inhibition de la multiplication du virus serait la conséquence d'une dégradation de l'ARN intracellulaire, ou d'une modification de son métabolisme telle que la synthèse du virus n'y soit plus possible.

1° *Synthèse du virus.* — Des fragments ont été plongés pendant une heure à 37° C dans une solution de ribonucléase (0,4 mg/ml G. B. I.).

Les témoins étaient mis en présence de l'enzyme à l'état oxydé, à la même concentration.

Après un lavage de trente minutes à 37° C dans la solution de Hanks, les fragments ont été infectés et l'incubation a eu lieu à 37° C. Le pouvoir hémagglutinant a été titré au cours du temps dans le milieu de culture. Les résultats de deux expériences identiques (fig. 4) ont montré que la multiplication du virus se produit dans les fragments qui ont subi une préincubation dans la ribonucléase, à la même vitesse que dans les témoins, mais la phase de latence est prolongée. La quantité finale de virus synthétisé est la même dans les deux cas.

2° *Renouvellement des protéines.* — Comme dans l'expérience précédente, des fragments de MCA ont subi une préincubation de une heure dans la ribonucléase, puis un lavage ; ils ont été ensuite mis en présence de phénylalanine radioactive. La vitesse d'incorporation de l'acide aminé dans les protéines ne semble pas avoir été modifiée par la ribonucléase.

3° *Renouvellement de l'ARN.* — Dans ce but, c'est l'incorporation d'adénine —  $^{14}\text{C}$  dans l'ARN des cellules de la membrane chorioallantoïdienne, traitée préalablement par la ribonucléase, que nous avons étudiée au cours du temps.

Bien que la radioactivité spécifique globale des précurseurs acido-solubles s'élève beaucoup plus rapidement dans les fragments traités à la ribonucléase, l'adénine y est incorporée plus lentement dans l'ARN. Par conséquent, le taux de renouvellement à un moment donné, exprimé par le rapport entre les radioactivités spécifiques globales de l'ARN et de la fraction

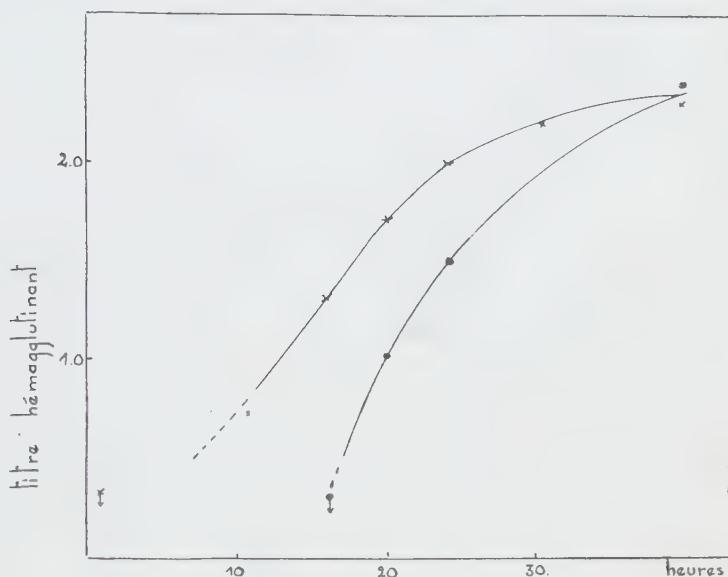


FIG. 4. — Multiplication du virus grippal dans la MCA normale (x) et traitée une heure par la ribonucléase avant l'infection (o).

acido-soluble, est plus faible dans les fragments traités par l'enzyme (fig. 5).

TABLEAU I.

Durée du lavage	Durée de l'incorporation	Radioactivités spécifiques (c./min/10 $\mu$ g N)	
		Témoins	Traités
0 H	1 H	5,2 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,6
"	2 H	11,6 $\pm$ 0,6	8,8 $\pm$ 1,4
"	3 H	14,4 $\pm$ 3,2	11,4 $\pm$ 0,1
1/2 H	2 H	8,4 $\pm$ 3	8,9 $\pm$ 2,4
1 H	"	10,3 $\pm$ 3,6	12,6 $\pm$ 2,4
3 H	"	12,3 $\pm$ 1,2	12,9 $\pm$ 2,6

Cette modification du métabolisme provoquée par la ribonucléase ne s'accompagne pas, pour autant que la précision des dosages permette d'en juger, d'une dégradation de l'ARN ou d'une modification de sa composition chimique.

En effet, le rapport quantitatif entre les bases puriques et les nucléotides pyrimidiques de l'ARN séparés par chromatographie, n'est pas changé de façon appréciable après un traitement de deux heures par la ribonucléase.

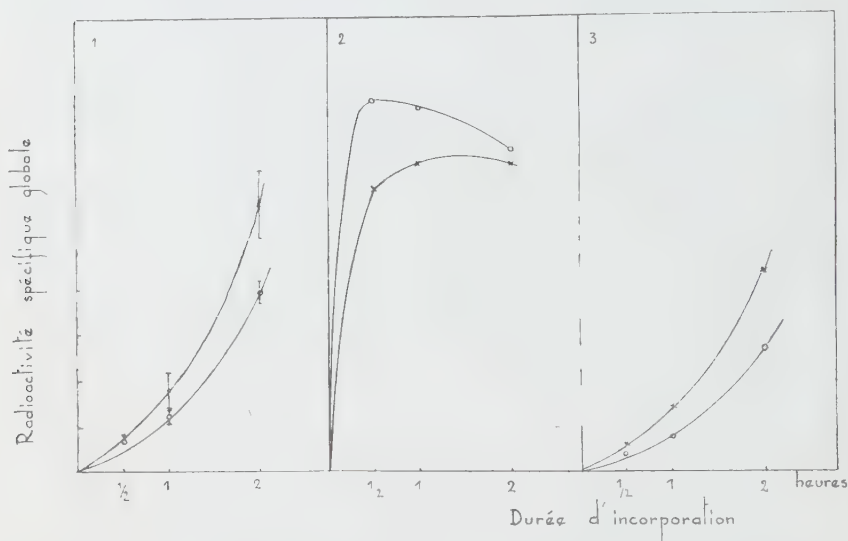


FIG. 5. — Incorporation d'adénine  $^{14}\text{C}$  dans la MCA normale (x) et traitée une heure par la ribonucléase (o). — 1, Radioactivité spécifique globale de l'ARN ; 2, Radioactivité spécifique des précurseurs acido-solubles ; 3, Pourcentage d'incorporation dans l'ARN.

C. ACTION DE LA RIBONUCLÉASE SUR LE MÉTABOLISME DE L'ARN AU COURS DES DEUX PREMIÈRES HEURES DE L'INFECTION. — Nous nous sommes alors intéressée au métabolisme de l'ARN dans les cellules infectées en présence de ribonucléase, pendant les deux heures qui suivent l'addition du virus ; nos expériences indiquaient, en effet, que c'est pendant cette période initiale que l'enzyme gêne la synthèse du virus. Nous avons tiré parti du fait que l'adénine est un précurseur des purines tandis que l'acide orotique est utilisé pour la formation des pyrimidines des acides nucléiques, pour étudier simultanément le métabolisme des purines et celui des pyrimidines dans les fragments de MCA infectés et normaux, en présence et en l'absence de l'enzyme.

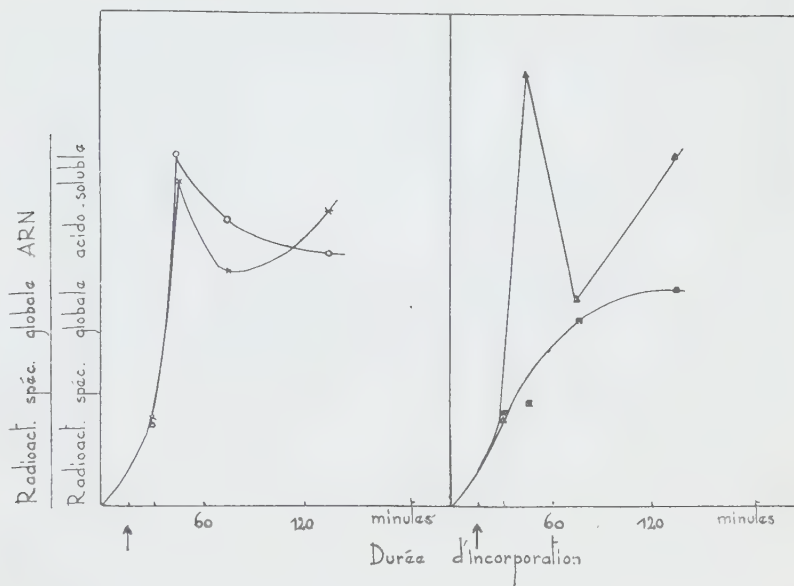


FIG. 6. — Pourcentage de renouvellement de l'adénine et de l'acide orotique dans l'ARN de la MCA normale (■), en présence de ribonucléase (▲), en présence du virus grippal (○) et en présence de l'enzyme et du virus (x). La flèche indique le moment d'addition de la ribonucléase et du virus.

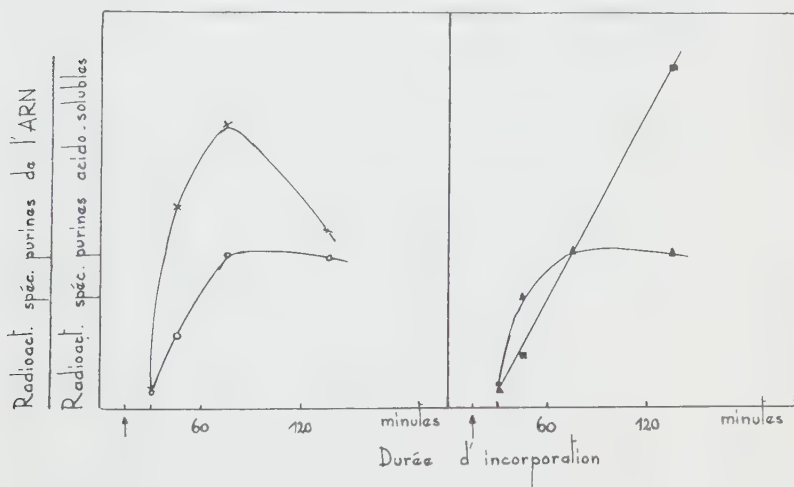


FIG. 7. — Pourcentage de renouvellement des purines de l'ARN dans la MCA normale (■), en présence de ribonucléase (▲), en présence du virus grippal (○) et en présence de l'enzyme et du virus (x).

Les figures ci-jointes résument les résultats de cette expérience.

Le rapport entre la radioactivité spécifique de l'ARN et celle des précurseurs acido-solubles, qui exprime le pourcentage de renouvellement (fig. 6) rend compte de l'activité métabolique fortement accrue de l'ARN, tant en présence de la ribonucléase qu'en présence du virus. La similitude des effets provoqués par l'enzyme et par le virus est frappante, qu'il s'agisse de l'ARN global ou des purines, dont le taux de renouvellement est exprimé dans la figure 7.

Cette analogie curieuse suggère que, peut-être, l'infection grippale s'accompagnerait d'une activation de la ribonucléase intracellulaire. Cette hypothèse est à l'étude actuellement.

Remarquons encore (fig. 7) que la ribonucléase intensifie nettement le métabolisme des purines quand le virus est présent dans les cellules. Cette observation permettra peut-être de mieux comprendre le mode d'action de l'enzyme sur la synthèse du virus.

#### IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION.

La ribonucléase exerce une action inhibitrice sur la multiplication du virus de la grippe, au cours des quatre-vingt-dix à cent vingt minutes qui suivent le moment où les cellules sont infectées. L'inhibition porte à la fois sur la synthèse des particules hémagglutinantes et infectantes ; elle ne s'obtient que lorsque la ribonucléase se trouve sous sa forme réduite.

L'enzyme n'inactive pas les particules virulentes en suspension dans le milieu extracellulaire ; il n'empêche, semble-t-il, ni l'adsorption, ni la pénétration du virus dans les cellules réceptrices.

Envisageons maintenant les différentes hypothèses susceptibles d'expliquer le mode d'action de la ribonucléase dans nos expériences.

a) *Action directe de l'enzyme sur l'ARN du virus.* — L'ARN du virus grippal semble être protégé par une enveloppe protéique : la ribonucléase, en effet, est sans action sur les particules virulentes isolées ; on sait que celles-ci apparaissent, au microscope électronique, comme des sphères limitées par deux enveloppes de densités différentes [27].

La ribonucléase pourrait dégrader l'ARN du virus au moment où les particules, après avoir pénétré dans les cellules, se dissolvent (phase d'éclipse). L'enzyme cesserait d'être actif à partir du moment où l'ARN aurait accompli son rôle de modèle génétique, c'est-à-dire une heure trente à deux heures après le début de l'infection. Ce moment correspond, à peu près, à l'apparition de l'antigène « soluble ».



b) *Action de la ribonucléase sur la cellule-hôte.* — Comme dans les racines d'oignons, les amibes et les cellules cancéreuses, la ribonucléase endommagerait les mécanismes de synthèses protéiques et nucléiques dans la membrane chorioallantoïde ; elle empêcherait, en particulier, la synthèse des constituants du virus.

Cette interprétation ne cadre pas avec le fait que des fragments de membrane prétraités par l'enzyme, où le métabolisme de l'ARN est pourtant altéré, effectuent une synthèse quasi normale de virus. Cette hypothèse nous paraît donc à rejeter.

c) *Action de la ribonucléase sur des processus métaboliques particuliers qui accompagneraient les premières phases de l'infection.* — En 1954, Hershey [28] a remarqué que, dès le moment de la pénétration des phages dans les bactéries, une petite fraction de l'ARN bactérien se distingue par une activité métabolique très intense.

Peu après, Jeener [29] a exprimé l'idée que l'ARN intervient dans la multiplication des phages. Des observations faites sur *B. megaterium* lui ont suggéré que la ribonucléase serait capable d'empêcher, non pas la maturation du prophage en phage, mais la synthèse des protéines du phage : l'acide désoxyribonucléique du phage, injecté dans la bactérie, ferait apparaître des molécules spécifiques d'ARN. Celles-ci, à leur tour, joueraient un rôle dans la synthèse des protéines du phage.

Les résultats de Volkin et Astrachan [30] ont confirmé cette idée : ils ont constaté, en effet, que, dans la bactérie infectée, le phosphore des acides adénylique et uridylique est renouvelé plus rapidement que celui des autres nucléotides : il s'agirait de la synthèse d'un type particulier d'ARN.

L'étude de l'incorporation simultanée d'adénine et d'acide orotique dans les fragments de la membrane chorioallantoïde nous a permis de mettre en évidence une activité métabolique intense de l'ARN, peu après la pénétration du virus grippal.

Lorsqu'elle est ajoutée aux cellules infectées, la ribonucléase provoque une accélération du métabolisme des pyrimidines (on sait que l'enzyme intervient au niveau des liaisons entre nucléotides pyrimidiques [31]) ; elle entraîne, en outre, une incorporation plus rapide de l'adénine dans l'ARN.

Sans que nous puissions préciser la signification de ce métabolisme intensifié des purines, nous croyons pouvoir conclure à un effet direct de l'enzyme sur l'ARN de la cellule infectée. Il est possible que les modifications apportées au métabolisme de l'ARN, à ce stade précoce de l'infection, expliquent l'inhibition de la synthèse du virus grippal par la ribonucléase.

Nous retiendrons cependant qu'une altération directe de l'ARN

des particules virulentes, après qu'elles ont pénétré dans la membrane, reste très probable.

#### RÉSUMÉ.

La multiplication du virus grippal (PR8) est inhibée par la ribonucléase sous sa forme réduite, enzymatiquement active. Pour que cette inhibition ait lieu, la présence de l'enzyme est requise à un moment assez précis du cycle infectieux, qui se situe entre une et deux heures après le début de l'infection, c'est-à-dire pendant la phase d'éclipse. Les autres phases du cycle paraissent insensibles à l'action de la ribonucléase.

Des membranes chorioallantoïdiennes traitées par la ribonucléase, puis lavées avant l'addition de virus, synthétisent normalement de nouvelles particules infectantes, malgré une altération marquée du métabolisme de l'ARN. Ainsi, l'influence inhibitrice de la ribonucléase doit relever d'une action directe, s'exerçant soit sur l'ARN du virus intracellulaire, au moment où celui-ci se dépouille de son enveloppe protéique protectrice, soit, peut-être, sur certains processus du métabolisme ribonucléique déclenchés par la pénétration du virus à l'intérieur des cellules.

#### SUMMARY

##### THE ACTION OF RIBONUCLEASE ON THE INFLUENZA VIRUS SYNTHESIS.

The multiplication of influenza virus (PR8) is inhibited by reduced ribonuclease, enzymatically active.

For this inhibition to be observed, the presence of the enzyme is required at a proper moment of the infective cycle, between 1 and 2 hours after the beginning of the infection, viz. during the eclipse phase. The other phases of the cycle do not seem to be affected by the ribonuclease.

Chorioallantoic membranes treated by ribonuclease and washed before the virus is added, synthesize normally infective particles, although the metabolism of the RNA is markedly altered. The inhibitory influence of the ribonuclease must depend on a direct action of the enzyme, either on the viral RNA when it comes out of its proteic shell, or, maybe, on certain processes of the RNA's metabolism promoted by the entry of the virus in the host cells.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRACHET (J.). The biological role of the pentose nucleic acids, in *The Nucleic Acids*, 1955, 2, 476. Acad. Press, New York.
- [2] BRACHET (J.). *Mécanismes biologiques et biochimiques de la synthèse des protéines*, Milan, 1955.

- [3] BRACHET (J.). L'action de la ribonucléase sur les cellules vivantes. *Pubbl. staz. zool. Napoli*, 1955, **27**, 146.
- [4] LEDOUX (L.), LE CLERC (J.) et VANDERHAEGHE (F.). *Nature*, 1954, **174**, 793.
- [5] LEDOUX (L.) et BALTUS (E.). *Experientia*, 1954, **10**, 500.
- [6] BRACHET (J.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 611.
- [7] BRACHET (J.). *Nature*, 1955, **175**, 851.
- [8] ADA (G.) et PERRY (B.). *Nature*, 1955, **175**, 209.
- [9] ADA (G.) et PERRY (B.). *Nature*, 1955, **157**, 854.
- [10] GIERER (A.) et SCHRAMM (G.). *Z. Naturf.*, 1956, **11 b**, 138.
- [11] FRAENKEL-CONRAT (H.) et WILLIAMS (R. C.). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1955, **41**, 690.
- [12] CASTERMAN et JEENER (R.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 433.
- [13] HAMERS-CASTERMAN (C.) et JEENER (R.). *Virology*, 1957, **3**, 197.
- [14] BARSKI (G.) et CORNEFERT (Fr.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 810.
- [15] TAMM (I.), FOLKERS (K.) et HORSFALL (F. L.). *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 219.
- [16] SALK (J. E.). *J. Immunol.*, 1944, **49**, 87.
- [17] HORSFALL (F. L.) et TAMM (I.). *J. Immunol.*, 1953, **70**, 253.
- [18] REED (L. J.) et MUENCH (H.). *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [19] KUNITZ (M.). *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 569.
- [20] LEDOUX (L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **13**, 121.
- [21] SCHNEIDER (W. C.). *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 239.
- [22] TYNER (E.), HEIDELBERGER (C.) et LE PAGE (G. A.). *Cancer Res.*, 1953, **13**, 186.
- [23] ABRAMS (R.). *Arch. Biochem.*, 1951, **30**, 44.
- [24] LEDOUX (L.) et BRACHET (J.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 290.
- [25] LEDOUX (L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **23**, 121.
- [26] TAMM (I.). [Communication personnelle], 1956.
- [27] MORGAN (C.), ROSE (H. M.) et MOORE (D. H.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 171.
- [28] HERSHEY (A. D.). *J. gen. Physiol.*, 1954, **37**, 1.
- [29] JEENER (R.). *III<sup>e</sup> Congrès Intern. Biochimie. Bruxelles*, 1955, Conférences et Rapports, p. 343.
- [30] VOLKIN (E.) et ASTRACHAN (L.). *Virology*, 1956, **2**, 149.
- [31] MARKHAM (R.) et SMITH (J.). *Biochem. J.*, 1952, **52**, 552.

**POSITION TAXONOMIQUE DE *MICROCOCCUS***  
**(*COCCOBACILLUS*) *MYCETOIDES* CASTELLANI 1942,**  
**AGENT ÉTIOLOGIQUE DE L'ULCÈRE TROPICALOÏDE**  
**(ULCÈRE DE CASTELLANI)**

par V. ORTALI et L. CAPOCACCIA (\*).

(*Istituto Superiore di Sanità di Roma*  
*et Clinica Tropicale Università di Roma*)

Durant la dernière guerre mondiale, il y eut parmi les troupes opérant en Afrique de nombreux cas d'ulcération contagieuse de la jambe que les médecins locaux ont appelée *ulcère tropical*.

Castellani la distingua de l'ulcère tropical proprement dit et lui donna le nom d'*ulcère tropicaloïde* ; en effet, l'ulcère tropical vrai est habituellement unique, profond et tendant au phagédénisme, tandis que l'ulcère tropicaloïde est multiple et superficiel. Il la distingua aussi de l'ulcère du Veld, qui est d'origine diphtérique et répond immédiatement au sérum anti-diphtérique. Dans la vésicule initiale, précédant le processus ulcératif, Castellani trouva toujours en culture pure un microorganisme polymorphe qu'il appela *Micrococcus* (*Coccobacillus*) *mycetoides*. Avec des cultures pures de ce microorganisme il reproduisit expérimentalement, chez des volontaires, l'ulcération typique. Des cas autochtones de l'ulcère tropicaloïde ont été trouvés en Italie par Castellani, Servino, Capocaccia et d'autres auteurs.

Au cours des dernières années, nous avons effectué une série de recherches, en employant aussi la microscopie électronique, dans le but de préciser la position taxonomique du microorganisme découvert par Castellani.

Nous avons étudié cinq souches, dont trois isolées en Afrique du Nord et deux en Italie. Les cinq souches ont présenté les mêmes caractères morphologiques, culturels et biologiques.

(\*) Manuscrit reçu le 12 août 1957.

*Caractères morphologiques et tinctoriaux.* — Le microorganisme se présente dans les lésions comme un petit coccus ou coccobacille, généralement Gram-négatif. En culture, on trouve des formes coccoïdes, coccobacillaires et bacillaires, et le microorganisme devient généralement Gram-positif ou présente des périodes irrégulières Gram-positives ou négatives. Dans les « milieux riches », comme la gélose glucosée ou la gélose à la caséine, les « bacilles » prédominent et peuvent être les seules formes présentes. Ils se montrent alors sous forme de bâtonnets, quelquefois légèrement incurvés, non sporogènes, immobiles, longs de 1, 2 ou 3  $\mu$ , larges de 0,3 à 0,5  $\mu$  ; la plupart sont Gram-positifs. Quelquefois, dans les cultures sur sérum de Loeffler, quelques éléments peuvent montrer un léger degré d'acido-résistance, disposée en bandes et ne comprenant jamais toute la cellule. La coloration d'Albert met très souvent en évidence deux grosses granulations colorées en noir acajou, quelquefois trois et même quatre (corpuscules métachromatiques, corpuscules polaires). L'examen au microscope électronique montre très bien ces corpuscules et certains bacilles très longs, divisés par deux ou même trois parois, suggérant les formations multicellulaires de Bisset. On ne voit jamais de capsules ou de parois muqueuses entourant les cellules, ou de cils.

*Cultures.* — L'ensemencement du contenu de la vésicule initiale encore intacte sur gélose simple ne donne généralement aucune colonie, mais si on emploie la gélose trypsinée, de petites colonies se développent, ressemblant à des colonies de streptocoques. Par la suite, le microorganisme s'adapte rapidement à tous les milieux usuels et sur les « milieux riches », comme par exemple la gélose glucosée ou la gélose à la caséine Difco, il produit un beau pigment jaune or ou jaune verdâtre, qui ne diffuse pas dans le milieu. Sur ces milieux, les colonies isolées sont arrondies, légèrement filantes, atteignant un diamètre d'à peu près 1 mm ; leur taille n'augmente plus après le troisième jour. Le microorganisme est un anaérobie facultatif, mais il pousse mieux en aérobose.

*Eau peptonée et bouillon.* — Développement pauvre en eau peptonée avec léger trouble. Développement très abondant en bouillon glucosé avec trouble important ; après quelques jours, il se forme un sédiment jaunâtre. Pas de pellicule. A l'examen microscopique de ces cultures, le microorganisme montre souvent une forme coccoïde et les cellules peuvent être disposées deux à deux, ou en groupes, ou même en petites chaînettes.

*Gélatine.* — Pas de liquéfaction.



*Sérum coagulé.* — Pas de liquéfaction.

*Lait.* — Ni acide, ni coagulation, ni peptonisation.

*Action fermentaire.* — Très faible. Il n'y a jamais de fermentation gazeuse. Production lente d'acide en milieu glucosé, pas évidente avec les autres sucres et d'autres substances que nous avons essayées : lévulose, maltose, D-mannose, arabinose, lactose, adonitol, amidon, arbutine, cellobiose, dextrine, dulcité, érythrite, esculine, galactose, glycogène, inositol, mannite, mélibiose, mutose, raffinose, I-raffinose, D-raffinose, D-ribose, saccharose, I-sorbose, tréhalose, xylose.

*Auxanogramme.* — Avec les méthodes auxanographiques de Beijerinck nous avons trouvé que les cinq souches utilisent le lévulose et le tréhalose en plus du glucose. Les substances essayées ont été les mêmes que celles que nous avons employées pour étudier l'action fermentaire.

*Autres caractères biologiques.* — Les cinq souches ont montré les mêmes caractères : indole, négatif ; Vosges-Proskauer, négatif ; rouge-méthyle, négatif ; réduction des nitrates (méthode Griess), absente ; phosphatase (méthode Braunn-King), positive ; uréase (méthode Ortali-Samerani), absente ; coagulase (méthode Cruickshank), absente.

*Sérologie.* — En inoculant au lapin des suspensions de micro-organisme nous avons obtenu des sérums qui ont agglutiné les cinq souches à l'étude à haute dilution et à peu près au même titre. Ces sérums n'ont agglutiné aucun des *Corynebacterium* de notre collection (cultures homogénéisées). Les sérums préparés avec ces bactéries, y compris le sérum antidiphthérique, n'ont pas agglutiné le *mycetoides*.

## LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — *Corynebacterium mycetoides*. Souche n° 1. Cultures de 48 heures sur Löffler. Formes bacillaires avec granules (coloration d'Albert)  $\times 2\,000$ .

FIG. 2. — *Corynebacterium mycetoides*. Souche n° 2 observée au microscope électronique. Préparation métallisée. On voit les granules polaires.  $\times 16\,000$ .

FIG. 3. — *Corynebacterium mycetoides*. Souche n° 1 observée au microscope électronique. Préparation métallisée. Le bâtonnet très long, au centre, présente une structure rappelant la formation multicellulaire de Bisset.

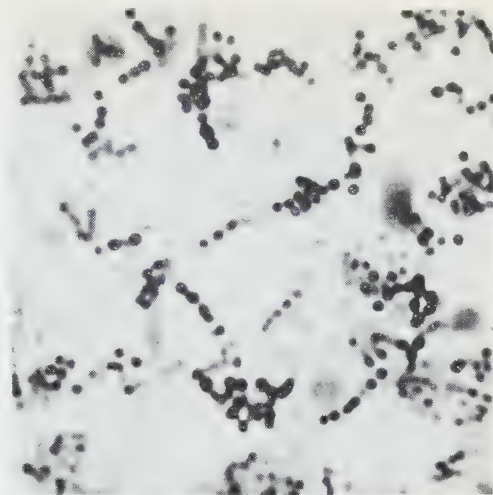


FIG. 1.

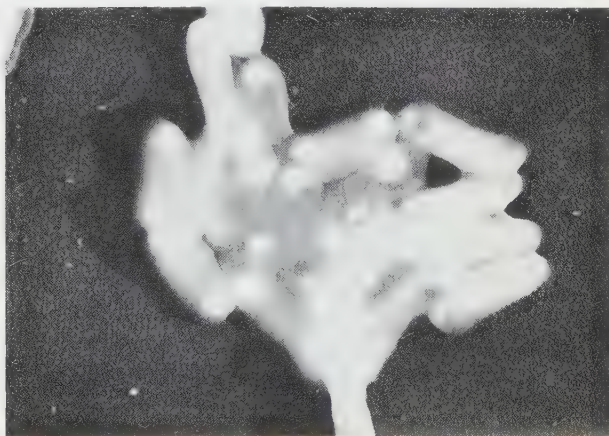


FIG. 2.

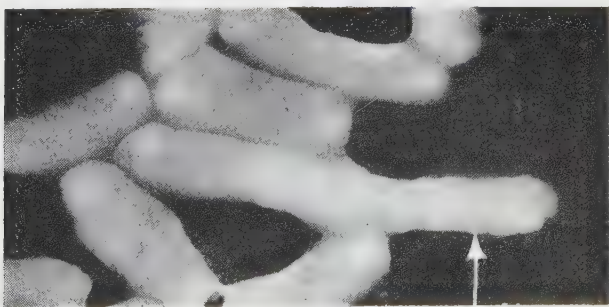


FIG. 3.



*Antibiogramme.* — Toutes les souches se sont comportées de la même manière : presque insensibles à la pénicilline, médiocrement sensibles à la chloromycétine, à la terramycine et à l'auréomycine, sensibles à la streptomycine et encore plus à la bacitracine.

*Pouvoir pathogène.* — Très bien étudié par Castellani, Servino et Urso. L'application d'une petite quantité d'une culture pure sur une scarification à la jambe reproduit chez l'homme l'ulcère typique. Le pouvoir pathogène persiste dans les vieilles souches après au moins douze ans de vie saprophytique sur les milieux de laboratoire. Le microorganisme n'a aucune action pathogène sur les petits animaux de laboratoire (lapin, cobaye, souris).

\*  
\*\*

Quelle est la position taxonomique de ce microorganisme qui, à cause de son polymorphisme, a été placé dans les genres les plus différents, y compris le genre *Micrococcus* et le genre *Streptococcus* ? Comme il s'agit d'un microorganisme non sporogène, immobile, aérobie (anaérobie facultatif), non protéolytique, de très faible action fermentaire, Gram-positif sous sa forme bacillaire, et présentant des granulations métachromatiques, il nous semble que sa position taxonomique correcte se trouve dans la famille des *Corynebacteriaceae*, genre *Corynebacterium*, comme Pergola l'a déjà suggéré. En effet, la famille des *Corynebacteriaceae* Lehmann et Neumann est définie par Bergey « *Eubacterineae*, non sporogène, aérobie ou micro-aérophile, Gram-positive, présentant souvent des granulations, immobile, sauf pour le genre *Listeria*, pouvant acidifier quelques glucides, mais ne produisant jamais de gaz ». Et le genre *Corynebacterium* Lehmann et Neumann est défini « *Corynebacteriaceae*, immobile, présentant des granules métachromatiques très évidents, typiques, ne liquéfiant pas la gélatine ».

Cependant, le microorganisme de Castellani ne peut être identifié à aucune espèce de ce genre à cause de son extrême polymorphisme, sa variabilité au Gram lorsqu'il est récemment isolé, de son abondant pigment jaune vif, jaune or, ou jaune verdâtre dans les cultures sur gélose glucosée, de son fermentogramme, de son auxonogramme, de son antibiogramme et de son action ulcérogène spécifique pour l'homme.

En conclusion, nous plaçons *Micrococcus (Coccobacillus) mycetoides* dans le genre *Corynebacterium*, et si notre classification est acceptée, son nom deviendra, suivant les règles de la nomenclature scientifique, *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali et Capocaccia 1956.

## SUMMARY

TAXONOMY OF *Micrococcus (Coccobacillus) mycetoides*  
CASTELLANI 1942,  
AGENT OF THE TROPICALOID ULCER (CASTELLANI'S ULCER).

The authors consider that *M. mycetoides* belongs to the genus *Corynebacterium*. If this classification is accepted, the name of the germ will become, according to the scientific nomenclature : *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali and Capocaccia 1956.

## BIBLIOGRAPHIE

- BERGEY. *Manual of Determinative Bacteriology*, Baillière, Tindall et Cox, London, 1948.
- BISSET (K. A.). *J. gen. Microb.*, 1949, **31**, 93.
- CASTELLANI (A.). *Ann. Igiene*, 1942, **12**, 349 ; *Arch. ital. Sci. med. col.*, 1943, **24**, 24 ; *J. trop. Med.*, 1948, **51**, 245 et 251 ; *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 83 ; *Arch. ital. Sci. med. col.*, 1955, **36**, 587 et 617 ; *J. trop. Med.*, 1957, **40** 3.
- CASTELLANI (A.), SERVINO (V.) et TARIZZO (M.). *Riv. Ist. sier. it.*, 1949, **24**, 9.
- CAPOCACCIA (L.) et CAO PINNA (M.). *Riassunti Cong. Int. Microb.*, 1953, **4**, 848.
- CAPOCACCIA (L.) et PARONI (F.). *Arch. ital. Sci. med. trop.*, 1954, **35**, 10.
- CAO PINNA (M.) et CAPOCACCIA (L.). *Arch. ital. Sci. med. trop.*, 1954, **35**, 10.
- PERGOLA (M.). *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 1954, **17**, 147.
- NEGRO (M.). *G. Batt.*, 1943, **30**, 701.
- PENSO (G.), ORTALI (V.), GAUDUANO (A.), PRINCIVALLE (M.), VELLA (L.) et ZAMPIERI (A.). *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 1951, **14**, 855.
- URSO (B.) et TRIPODI (P.). *Acta Medica it.*, 1949, **6**, 23.
-



# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

Séance du 3 Octobre 1957

Présidence de M. PRÉVOT.

---

## COMMUNICATIONS

### UN NOUVEAU SÉROTYPE DU GROUPE *SALMONELLA* ISOLÉ AU CONGO BELGE (*S. BUSINGA* = 6, 7 : z : e, n, z<sub>15</sub>)

par E. van OYE et C. LUCASSE.

(*Institut de Médecine Tropicale « Princesse Astrid », Léopoldville*  
[Directeur : D<sup>r</sup> van OYE]  
*et Laboratoire Médical Provincial, Coquilhatville*  
[Directeur : D<sup>r</sup> C. LUCASSE])

La nouvelle *Salmonella* qui sera décrite dans la présente note a été isolée par coproculture chez un Européen, vivant au Congo Belge, qui souffrait de graves troubles gastro-intestinaux compliqués d'une appendicite aiguë. La guérison a été difficile.

Il s'agit d'un bacille qui possède tous les caractères morphologiques et culturels d'une Entérobactérie et dont les propriétés biochimiques sont les suivantes : fermentation, dans les vingt-quatre heures et avec production de gaz, de l'arabinose, de la dulcité, du glucose, du maltose, de la mannite, du rhamnose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. Ne sont pas attaqués en trente jours : l'adonite, l'inosite, le lactose, le saccharose et la salicine.

Le germe produit de l'H<sub>2</sub>S et réduit les nitrates. La réaction de Stern est positive. Le test de Braun au KCN est négatif.

Il n'y a pas de production d'indole, ni de décomposition de l'urée. La gélatine n'est pas liquéfiée.

La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge de méthyl est positive.

Les résultats suivants sont obtenus dans les milieux contenant des acides organiques : D-tartrate +<sup>1</sup>, L-tartrate +<sup>1</sup>, I-tartrate +<sup>2</sup>, citrate de soude +<sup>1</sup>, mucate +<sup>1</sup>.

Ces propriétés biochimiques permettent de classer le germe dans le groupe des *Salmonellae*, famille des Entérobactéries.

La culture est agglutinée par un sérum anti-O : 6, 7, 8 polyvalent et par un sérum anti-O : 7 pur ; elle ne l'est pas par un sérum anti-O : 8 pur. Le germe appartient donc au sous-groupe sérologique C. 1.

L'antigène flagellaire de la phase I est agglutiné par un sérum anti-H : z, à l'exclusion de tous les autres.

L'antigène de la phase flagellaire II est agglutiné par un sérum non absorbé anti-H : e, n, x ainsi que par un sérum absorbé anti-H : z<sub>15</sub>.

La formule antigénique complète est donc : 6, 7 : z : e, n, z<sub>15</sub>.

Le nom de *Salmonella businga* a été proposé et accepté.

*Résumé.* — Les auteurs décrivent un nouveau sérotype du groupe *Salmonella* isolé chez un Européen vivant au Congo Belge qui souffrait de graves troubles gastro-intestinaux, *S. businga* = 6, 7 : z : e, n, z<sub>15</sub>.

### SUMMARY

A NEW *Salmonella* TYPE ISOLATED IN THE BELGIAN CONGO : *S. businga*.

The authors describe a new *Salmonella* serotype isolated from the stools of an European living in the Belgian Congo who suffered from severe gastro-intestinal disorders, *S. businga* = 6, 7 : z : e, n, z<sub>15</sub>.

★  
★ ★

Nous tenons à remercier le Dr F. Kauffmann (Directeur du Centre International des *Salmonellae* à Copenhague) d'avoir eu l'obligeance de nous communiquer les résultats des réactions des acides organiques et d'avoir contrôlé notre diagnose de la structure antigénique.

## MISE AU POINT DES TECHNIQUES DE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DES VITAMINES B<sub>3</sub> ET B<sub>5</sub>

par J. MALGRAS, J. MEYER et R. PAX.

(Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Strasbourg)

Depuis plusieurs années déjà, nous avons pu nous rendre compte de la valeur des techniques microbiologiques dans le dosage des vitamines. Après avoir étudié le dosage de quelques facteurs de croissance dans les milieux de culture, tels que le milieu à base d'hydrolysate de protéines [1] et le milieu Vf de l'Institut Pasteur [2], l'un de nous a fait un travail sur le dosage des vitamines dans les milieux biologiques.

Les résultats ainsi obtenus nous ont amenés à reprendre cette question, à modifier les diverses techniques de la littérature pour les rendre suffisamment rigoureuses, afin de déterminer quantitativement les vitamines dans les humeurs de l'homme et des animaux de laboratoire [3].

Nous nous sommes particulièrement attachés au dosage des deux vitamines : la niacine d'une part, l'acide pantothénique d'autre part, qui a déjà fait l'objet de nombreux travaux dans notre laboratoire [4, 5, 6, 7].

La technique de base est dans les deux cas celle décrite par Snell et Wright [8], dans laquelle le microorganisme-test est une bactérie lactique tributaire de la présence dans le milieu de culture de certaines vitamines spécifiques. L'appréciation quantitative est fournie par la mesure à l'électrophotomètre du trouble produit par la croissance du *Lactobacillus arabinosus* 17-5, ou par la mesure de l'acidité développée par la fermentation d'un sucre.

Pour la bonne conduite des dosages, il est important de tenir compte des propriétés des deux vitamines, de leur répartition dans l'organisme et des formes conjuguées que l'on peut y rencontrer. Si l'on veut saisir la totalité de ces facteurs dans les liquides biologiques ou dans les tissus, il faut, au préalable, les soumettre à un traitement adéquat. Il est particulièrement important, en effet, d'obtenir un liquide dépourvu de toute substance gênante, mais comprenant l'intégralité des vitamines à doser.

Le liquide biologique doit subir un traitement qui va permettre l'élimination des protéines capables de précipiter pendant l'autoclavage et l'étuvage, permettant d'éliminer également les acides aminés susceptibles de servir de facteur de stimulation de croissance du *Lactobacillus arabinosus* 17-5, traitement amenant les complexes et les combinaisons vitaminiques sous forme de substances utilisables pour la bactérie-test, tout en respectant les propriétés chimiques et physiques de la vitamine.

La grande stabilité de la nicotinamide permet une manipulation relativement aisée, alors que l'acide pantothénique doit être dosé avec de multiples précautions à cause de sa très grande fragilité.

Après plusieurs essais, nous avons dosé la vitamine PP dans le sang (1 cm<sup>3</sup>) après hydrolyse en milieu acide (HCl 0,2 N : 5 cm<sup>3</sup>) au bain-marie à 100° pendant une heure. Après refroidissement, les protéines sont précipitées à pH 6,2. De même, en ce qui concerne l'acide pantothénique, nous sommes arrivés à la conclusion qu'il était préférable de réaliser le dosage sur le plasma sanguin (1 cm<sup>3</sup> de plasma + 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée) hydrolysé à 42° pendant seize heures, en milieu légèrement acide (pH 4,5). Après l'hydrolyse, on précipite les protéines comme précédemment à pH 6,2.

Pour le dosage de la vitamine PP dans l'urine (1 cm<sup>3</sup>), nous avons constaté que l'hydrolyse acide (HCl 0,2 N : 5 cm<sup>3</sup>) au bain-marie bouillant pendant deux heures donnait les meilleurs résultats. Cette technique de traitement préalable de l'urine nous a permis de trouver des taux de vitamine PP correspondant aux valeurs de la nicotinamurie rapportées par différents auteurs, tels que Harris et Raymond [9] et Hullstrung et Steitz [10].

Dans le cas de la vitamine B<sub>5</sub>, après avoir stérilisé l'urine par ultra-filtration, on la soumet au même traitement que le sang. Ajuster à pH 4,5 par HCl N/10 et disposer à 42° pendant seize heures. Ramener à pH 6,7 et diluer l'urine au 1/50 pour le dosage.

La technique concernant le dosage proprement dit en présence de *Lactobacillus arabinosus* 17-5 s'effectue alors ainsi que la décrit Bischhausen [41]. Il faut noter, cependant, certaines modifications apportées à cette technique, dont les plus importantes sont les suivantes.

L'eau salée qui, généralement, est de l'eau physiologique à 8,5 p. 1 000, s'est révélée être hypertonique vis-à-vis du *Lactobacillus*; les meilleurs résultats ont été fournis par de l'eau salée à 6 p. 1 000 pour le lavage du culot de bactéries et la préparation de l'émulsion bactérienne (culture de vingt-quatre heures) que nous avons réalisée au 1/20, puis mise en suspension dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau salée au même taux.

Nous avons également déterminé que le meilleur inoculum est d'un quarantième de centimètre cube de la précédente émulsion.

Bien entendu, chaque dosage doit être accompagné d'une gamme-étalon, car il est indispensable que les résultats du dosage dans le liquide biologique restent dans les limites assez étroites de cette gamme-étalon.

Le temps d'incubation ne peut être quelconque, et nous avons déterminé que le temps optimum est de quarante heures de culture à 37°.

Dans toute la conduite de nos dosages, nous avons utilisé les milieux déshydratés des Laboratoires DIFCO, mais nous avons constaté qu'en ce qui concerne l'entretien de la souche sur le Micro Assay Culture Agar Difco, les repiquages successifs aboutissaient finalement à un germe mutant, ne présentant plus les mêmes caractères que la bactérie originelle, c'est-à-dire une bactérie pouvant se libérer du besoin vital en facteur de croissance. L'emploi de souches lyophilisées est certainement la méthode idéale, car elle permet d'utiliser tous les mois une nouvelle souche de la bactérie-test que l'on repique tous les dix jours sur la gélose d'entretien fraîchement préparée.

Les erreurs qui peuvent être commises dans de tels dosages sont multiples : erreurs de lecture, erreurs de manipulation, erreurs dues au matériel utilisé. Nous avons calculé, d'après les nombreuses expériences réalisées, que, compte tenu de ces faits, l'erreur maxima relative de la méthode est généralement inférieure à 10 p. 100.

La mise au point de cette technique avait pour but l'étude de la variation du taux de ces deux vitamines dans les liquides biologiques de tuberculeux soumis au traitement par le rimifon, le PAS et la streptomycine, étude qui fera l'objet d'une publication ultérieure.

RÉSUMÉ. — Mise au point d'une technique de dosage microbiologique à l'acide pantothénique et de la vitamine PP dans le sang et les urines.

Préparation du liquide biologique par un traitement adéquat, permettant l'élimination des substances gênantes.

Modifications apportées à la technique classique de Snell et Wright.

## SUMMARY

STUDIES ON THE TECHNIQUES OF MICROBIOLOGICAL ASSAY OF B3  
AND B5 VITAMINS IN BLOOD AND URINE.

Report of a technique of microbiological assay of pantothenic acid and PP vitamin in blood and urine. Preparation of the biological fluid by an adequate treatment allowing to eliminate disturbing substances. Modifications of Snell and Wright's classical techniques.

## BIBLIOGRAPHIE

- [4] MEYER (J.), MALGRAS (J.), SARTORY (R.) et CLAVELIN (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 664.
- [2] MEYER (J.), SARTORY (R.), MALGRAS (J.) et SUPPGER (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, n° 103, 358.
- [3] PAX (R.). Le métabolisme de la niacine et de l'acide pantothénique chez les tuberculeux soumis à l'antibiothérapie spécifique. *Thèse Doct. Pharm.*, Strasbourg, 1957.
- [4] MEYER (J.), MALGRAS (J.) et HIRTZ (G.). *Rev. Immunol.*, 1955, **19**, n° 4, 337.
- [5] MEYER (J.), MALGRAS (J.) et PONNELLE (J.). *Rev. Immunol.*, 1955, **19**, 414.
- [6] SARTORY (R.), MEYER (J.), MALGRAS (J.) et PONNELLE (J.). *Rev. Immunol.*, 1956, **20**, 55-57.
- [7] MEYER (J.), MALGRAS (J.) et BISCHHAUSEN (P.). *Rev. Tub.*, 1956, **20**, 809.
- [8] SNELL et WRIGHT. *J. Biol. Chem.*, 1940, **134**, 137.
- [9] HARRIS et RAYMOND. *Biochem. J.*, 1939, **33**, 2037.
- [10] HULLSTRUNG et STEITZ. *Klin. Wschr.*, 1941, **20**, 612.
- [41] BISCHHAUSEN (P.). Etude de quelques vitamines hydrosolubles dans le sang de tuberculeux. *Thèse Doct. Pharm.*, Strasbourg, 1956.

## DÉTERMINATION DE MYCOBACTÉRIES AU MOYEN DE L'ŒIL DU LAPIN

par J. F. COSTER et H. H. VINK

(présenté par M. van DEINSE).

(*Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht*)

Deux questions intéressent le clinicien quand il s'adresse au bactériologue pour le diagnostic de tuberculose : 1° Les produits pathologiques qu'il lui envoie contiennent-ils des bacilles tuberculeux ? 2° S'il s'agit d'un abcès formé à la suite d'une inoculation de BCG, le pus contient-il du BCG ou des bacilles tuberculeux ?

Il devient de plus en plus difficile de répondre à la première ques-



tion. Grâce à la chimiothérapie, les produits que reçoit le bactériologue contiennent de moins en moins de bactéries, ou bien la présence fortuite d'un saprophyte acido-résistant risque d'induire en erreur le clinicien. Les choses se compliquent par l'existence de bacilles tuberculeux INH-résistants de plus en plus nombreux dont la virulence, pour le cobaye, a fortement diminué. Pour venir à bout de ces difficultés, nous nous servons, depuis deux ans, d'une épreuve simple, permettant de distinguer les vrais bacilles tuberculeux des saprophytes [1].

Nous ensemençons le matériel, d'une part sur milieu de Löwenstein que nous mettons à l'étuve à 24° (seuls les saprophytes se développent dans ces conditions), d'autre part sur Löwenstein contenant 10 µg d'INH par millilitre en mettant ces derniers tubes à l'étuve à 37°. Dans ces conditions, presque tous les saprophytes se développent ainsi que les bacilles tuberculeux INH-résistants ; les premiers sont catalase-positifs, les derniers généralement négatifs ; en versant 1 ml d'un mélange de Tween 80 à 10 p. 100 et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 15 p. 100 sur cette culture, une forte production de mousse indique la présence de catalase et donc, probablement, de saprophytes.

Il existe, cependant, quelques souches douteuses, soit des bacilles tuberculeux INH-résistants mais catalase-positifs, soit quelques rares saprophytes qui ne se développent ni à 24°, ni sur milieu contenant de l'INH. Nous avons cherché, pour cette raison, une épreuve sur l'animal susceptible de fournir un complément de certitude et nous permettant, en outre, de reconnaître le BCG éventuellement présent dans les produits pathologiques.

Cette épreuve consiste en l'injection, dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, d'une suspension de la souche à l'étude. Après anesthésie de la cornée par quelques gouttes de cocaïne, nous prélevons, avec une aiguille fine, 0,1 ml de liquide et le remplaçons par la suspension bacillaire.

L'injection de bacilles tuberculeux dans la chambre antérieure de l'œil est une technique déjà ancienne. Koch [2] a fait ses premières expériences sur l'animal de cette façon avec des cultures de bacilles tuberculeux, probablement parce que l'infection prend et évolue rapidement, mais il abandonna bientôt cette méthode pour l'épreuve plus simple du cobaye. Schieck [3] a essayé, par cette technique, de distinguer les types humain et bovin du bacille tuberculeux. Morax et Nida [4] ont inoculé de cette façon des souches tuberculeuses virulentes et atténuées ainsi que du BCG, pour étudier la virulence. Dans un travail récent, des chercheurs japonais [5] décrivent l'inoculation de BCG dans l'œil du lapin, technique utilisée par eux pour étudier, sur place, le pouvoir pathogène du BCG. Certains chercheurs ont encore utilisé l'infection oculaire expérimentale pour étudier les effets de certaines substances chimiothérapeutiques, probablement à cause de la bonne visibilité des lésions. A notre connaissance, personne n'a encore utilisé cette technique dans un but de diagnostic.

Les premières lésions deviennent visibles huit à douze jours après l'inoculation aussi bien pour les souches virulentes que pour les cultures atténuées. L'iris s'épaissit, le liquide devient trouble, le Tyndal

positif, la pupille perd sa réactivité et se déforme, des granulations gris clair apparaissent dans l'iris. Si les bacilles injectés sont virulents, le processus évolue, des vaisseaux sanguins se développent sur la cornée, formant un pannus complet à partir du bord ; dans l'œil se forment des synéchies, la pression intérieure augmente, il se produit du glaucome et l'œil finit par être complètement détruit. En outre, les souches bovines provoquent une généralisation dans les viscères trois à quatre semaines après l'injection.

Quand il s'agit d'une culture atténuée ou non virulente, le processus s'arrête et devient stationnaire d'après l'atténuation plus ou moins poussée et finit par guérir en laissant des lésions cicatricielles. Le nombre de bacilles injectés a son influence sur l'importance des lésions ; en ne dépassant jamais la dose de  $10^3$  à  $10^4$ , on obtient des résultats à peu près identiques d'une injection à l'autre avec la même souche. Un saprophyte ne provoque jamais les lésions que nous venons de décrire, mais tout au plus une inflammation non spécifique visible sous forme d'un dépôt blanc sur l'iris. Les différentes lésions sont le plus caractéristiques un mois après l'inoculation.

Nous donnons quelques exemples.

Un œil inoculé avec une souche humaine virulente nouvellement isolée est entièrement couvert d'un pannus après quatre semaines. En ouvrant ce pannus, on voit de nombreuses granulations dans l'iris et sur la cornée ainsi que des synéchies entre l'iris et la lentille. A l'examen histologique, on constate, dans la cornée, une forte infiltration de leucocytes avec vascularisation surtout au centre et à la face intérieure ; il y a quelques amas de cellules épithélioïdes et quelquefois quelques centres nécrotiques ; sous la cornée, se trouve une couche de fibrine contenant des cellules fortement dégradées ; à certains endroits, notamment dans l'iris, on voit des granulations tuberculeuses typiques contenant parfois quelques cellules géantes.

Un œil inoculé avec du BCG montre, à l'examen macroscopique, un iris un peu plissé qui, après l'ouverture de l'œil, apparaît couvert de nombreux petits foyers légèrement surélevés, d'une taille inférieure à une tête d'épingle. A l'examen histologique, l'iris contient de nombreux tubercules dont certains assez volumineux, composés de cellules épithélioïdes et de quelques lymphocytes et leucocytes ; les plus grandes de ces granulations sont nécrotiques à leur centre, et, ici, on trouve des bacilles acido-résistants. Entre les granulations on voit de l'infiltration diffuse avec des cellules plasmatiques et des lymphocytes.

Un bacille faiblement virulent INH-résistant provoque des lésions se présentant comme une transition entre la première et la seconde des descriptions.

Des saprophytes ne provoquent qu'un peu d'infiltration cellulaire non spécifique ou pas de lésions du tout.

En résumé, nous croyons, grâce à la technique que nous venons de décrire, pouvoir nous prononcer avec plus de certitude sur la nature de certaines mycobactéries non virulentes pour le cobaye, et notamment distinguer un *Mycobacterium tuberculosis* atténué d'un saprophyte acido-résistant. La méthode nous permet, en outre, de nous faire une idée du degré d'atténuation et de reconnaître ainsi le BCG quand nous nous trouvons en présence d'un bacille sensible à l'INH.

## SUMMARY

DIAGNOSTIC OF MYCOBACTERIA BY MEANS OF INOCULATION  
IN THE RABBIT EYE.

The technique described allows the diagnosis of certain Mycobacteria which are not virulent for the guinea-pig, and the differentiation of an attenuated *M. tuberculosis* from an acid-fast saprophyte. The method allows also to appreciate the degree of attenuation and to identify BCG among INH-sensitive Mycobacteria.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] COSTER (J. F.) et MANTEN (A.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 958.
- [2] KOCH (R.). *Mittheilungen des Kaiserlichen Gesundheitsamts*, 1884.
- [3] SCHIECK (F.). *Dtsch. Med. Wschr.*, 1911, **37**, 729.
- [4] MORAX (V.) et NIDA (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **54**, 556.
- [5] KIYOSI SAKAKI. *Science Rep. Research Inst. Tohoku Univ.*, 1956, **7**, 75.

## SUR LES LÉSIONS CELLULAIRES PROVOQUÉES PAR LES ADÉNO-VIRUS 7 ET 7a

par M. PRUNIERAS, Y. CHARDONNET et R. SOHIER.

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine, Lyon)

Nous rapporterons, dans cette brève note préliminaire, les résultats obtenus sur cultures continues de cellules HeLa (1) et T (2) infectées par les adéno-virus de type 7 (3) [1 souche] et type 7a (4) [4 souches]. Les types de virus, les dilutions utilisées, les milieux de culture, les techniques d'observation employées seront précisées dans une publication à paraître prochainement [7].

L'étude a porté, d'une part, sur les aspects morphologiques des effets cytopathogènes constatés après coloration par le Giemsa et, d'autre part, sur l'étude qualitative des acides ribo- et désoxyribonucléiques appréciés par le test de Brachet.

En étudiant la progression des altérations cellulaires, il est possible de retrouver pour les types 7 et 7a les mêmes images morphologiques

(1) Souche isolée par Gey d'un cancer épidermoïde de l'utérus provenant du laboratoire du Dr Syverton.

(2) Souche d'épithélium de rein d'embryon humain provenant du laboratoire du Dr Dekking.

(3) Souche adressée au laboratoire par Huebner.

(4) Souches isolées au Laboratoire d'Hygiène.

que celles qui ont été décrites pour d'autres types d'adéno-virus par des auteurs comme Kjellen [4, 5], Harford [3], Morgan [6], Barski [4], et qui consistent essentiellement soit dans le gonflement du noyau qui peut atteindre des tailles doubles et triples de la normale et présenter un aspect d'homogénéisation ou un aspect réticulé, soit dans l'apparition à l'intérieur de ces noyaux ou bien de masses basophiles ayant tendance à se réunir au centre, ou bien de vacuoles de tailles diverses allant jusqu'à la rupture de la membrane nucléaire.

Ces altérations morphologiques nucléaires nous ont paru difficiles à relier entre elles dans le temps, de telle sorte que nous ne savons pas si les lésions primitives consistent en homogénéisation avec gonflement, ou bien en micro-vacuoles. Il est possible que les altérations morphologiques dépendent autant de l'état des métabolismes nucléaires au moment de la pénétration du virus que du mode de pénétration de ce dernier. Il est également possible que d'autres effets cytopathogènes associés à l'introduction dans le milieu de la suspension virale viennent perturber la spécificité morphologique.

Pour ces raisons, nous avons surtout porté notre attention sur les résultats du test de Brachet, qui remplace pour nous par la spécificité vis-à-vis des acides nucléiques la valeur plus discutable des aspects morphologiques. Grâce à ce test et en utilisant le test de Feulgen comme contrôle de la vert-de-méthylphilie, il nous a été possible de mettre en évidence :

1° Que la cellule infectée toujours vivante présente des bouleversements considérables de la répartition dans son noyau des acides désoxyribonucléiques (Harford [3], Boyer [2]).

2° Qu'en même temps que les acides désoxyribonucléiques se modifient, les acides ribonucléiques cytoplasmiques sont en considérable augmentation [Barski (5)].

3° Qu'en plus de l'augmentation des acides ribonucléiques cytoplasmiques, il existe d'énormes variations de la teneur en acides ribonucléiques du noyau. En effet, si dans le cas de la vacuolisation, les acides ribonucléiques nucléolaires disparaissent complètement, bien que les acides ribonucléiques cytoplasmiques soient augmentés, on trouve d'autres aspects dans lesquels on voit, au centre du noyau, dont la taille est peu modifiée, une masse occupant les deux tiers de cet organe intensément pyroninophile et négativée par la ribonucléase.

4° Enfin, que sur un même noyau on peut voir une masse centrale pyroninophile, une zone vacuolisée et une zone homogénéisée.

En nous basant sur ces résultats, il nous a paru que l'augmentation des acides ribonucléiques cytoplasmiques et nucléaires représentait une caractéristique cytochimique essentielle des effets cytopathogènes produits par les adéno-virus 7 et 7a. Des recherches sont en cours pour savoir si les mêmes effets sont produits par d'autres souches.

RÉSUMÉ. — Au cours de recherches sur les lésions provoquées par les adéno-virus 7 et 7a dans les cellules humaines en cultures continues provenant d'un cancer utérin (HeLa) et d'embryon de rein

(5) Communication personnelle.

humain (T), les auteurs ont mis en évidence par le test de Brachet une augmentation considérable des acides ribonucléiques cytoplasmiques et nucléaires.

### SUMMARY

STUDIES ON THE CELLULAR LESIONS INDUCED  
BY 7 AND 7a ADENOVIRUSES.

In the lesions induced by 7 and 7a adenoviruses in cultures of HeLa cells and of human embryonic kidney, the authors have demonstrated, by means of Brachet's test, a considerable increase of cytoplasmic and nuclear ribonucleic acid.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 614.
- [2] BOYER (V.), LEUCHTENBERGER (C.) et GINSBERG (H. S.). *J. exp. Med.*, 1957, **105**, 195.
- [3] HARFORD (C. J.), HAMLIN (A.), PARKER (E.) et RAVENSWAY (T. VAN). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 443.
- [4] KJELLEN (L.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1955, **6**, 45.
- [5] LAGERMAN (G.), KJELLEN (L.), THORSSON (K. G.) et SVEDMYR (A.). *Arch. ges. Virusforsch.*, 1957, **7**, 221.
- [6] MORGAN (C.), HOWE (C.), ROSE (H. M.) et MOORE (D. H.). *J. Biophys Biochem. Cytol.*, 1956, **2**, 351.
- [7] PRUNIERAS (M.) et CHARDONNET (Y.). [A paraître.]

## UNE PASTEURELLA NOUVELLE ISOLÉE D'ABCÈS PULMONAIRES DU RAT BLANC

par E. SACQUET.

(Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Alfort  
[Directeur : Professeur J. VERGE])

Nous isolons d'un rat blanc qui présente des abcès multiples du poumon une bactérie qui semble appartenir à la famille des *Parvobacteriaceae* et qui paraît ne jamais avoir été décrite. Voici, brièvement exposés, les caractères de cette bactérie.

**MORPHOLOGIE.** — Dans le pus, elle se présente sous la forme de coccobacilles Gram-négatifs de très petites dimensions.

En culture, la bactérie montre un pléomorphisme marqué : à côté



de coccobacilles de 1 à 2  $\mu$  de long, existent des bacilles volumineux et des filaments.

Elle est immobile dans les cultures faites à 20° et à 37°.

**CARACTÈRES CULTURAUX.** — La culture se développe sous forme de grains qui se disposent sur les parois et dans le fond du tube et laissent le milieu clair. Après vingt-quatre ou quarante-huit heures d'incubation, un trouble secondaire apparaît. Dès le deuxième repiquage, on n'observe plus de grains et la culture, d'emblée, trouble le milieu.

*Eau peptonée.* — Dans ce milieu, la culture est très abondante et se fait sous forme de flocons. Le milieu ne se trouble pas lorsque l'incubation est prolongée. Un léger anneau, adhérent à la paroi du tube, se développe à la surface du milieu.

*Eau de levure.* — La bactérie cultive abondamment dans ce milieu. La culture a le même aspect qu'en eau peptonée.

*Gélose.* — La surface des colonies est mamelonnée, extrêmement irrégulière; le centre est pigmenté en brun. Cette pigmentation s'accroît dans les jours qui suivent et vire au brun noir. La base de la colonie s'incruste dans la gélose. Ces colonies, très sèches, sont difficiles à prélever et s'émulsionnent mal en sérum physiologique.

Dès le deuxième passage, les colonies se modifient; elles perdent cet aspect irrégulier, deviennent lisses, régulièrement convexes, translucides; leur pigmentation diminue et elles apparaissent légèrement jaunâtres. Elles ne s'incrustent plus dans la gélose et deviennent faciles à prélever.

Certaines colonies présentent des aspects intermédiaires: autour d'une colonie rugueuse se développe une zone ayant les caractères du type lisse. Enfin, en milieu humide les colonies deviennent grasses et légèrement muqueuses.

*Gélose sérum.* — A l'isolement, la croissance est plus abondante sur gélose sérum que sur gélose ordinaire. Il apparaît évident que des éléments qui ne se développent pas sur gélose ordinaire donnent naissance à des colonies sur gélose sérum. Les colonies ont le même aspect que sur gélose ordinaire mais sont moins pigmentées.

*Gélose Veillon.* — La culture se développe sur toute la hauteur du tube; la bactérie est donc aéro-anaérobie.

**CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.** — La souche n'attaque ni le lactose, ni la glycérine, ni la dulcité. Elle attaque sans produire de gaz le glucose, le saccharose, le maltose, le lévulose, le galactose, la mannite. Elle donne des résultats douteux avec le rhamnose. Elle ne produit pas d'indole et ne liquéfie pas la gélatine. Elle possède une uréase et vire le milieu de Roland-Bourbon en quelques heures. Elle produit de l'hydrogène sulfuré.

*Pouvoir hémolytique.* — Sur gélose au sang de mouton, une zone étroite d'hémolyse apparaît après quarante-huit heures de culture.

*Conservation.* — Au frigidaire à  $+4^{\circ}$  la vitalité est gardée pendant plus de quinze jours, ce qui n'est généralement pas le cas avec les *Pasteurella*.

*Variation.* — L'aspect de la culture en bouillon et sur gélose se modifie rapidement. Ces modifications traduisent l'adaptation de la souche au milieu de culture. Les colonies lisses conservent un certain pouvoir pathogène : l'inoculation des colonies lisses à la souris permet d'obtenir à l'isolement des colonies de type rugueux.

Les grains observés dans les cultures en bouillon correspondent au type rugueux ; le trouble homogène correspond au type lisse.

**POUVOIR PATHOGÈNE.** — Il est faible, mais réel. La souche est isolée d'abcès multiples du poumon, d'un rat blanc. L'animal qui présente ces lésions est dans un état de misère physiologique avancée. Des trois rats blancs issus de cet élevage que nous autopsions, il est le seul à présenter ces abcès du poumon.

L'inoculation au rat, par la voie sous-cutanée, aboutit à la formation d'un énorme abcès qui atteint la taille d'une noix. L'inoculation intrapéritonéale de 0,5 ml de culture en bouillon tue le rat blanc en dix jours avec formation d'abcès multiples au niveau du mésentère.

L'inoculation intrapéritonéale de 0,5 ml de culture en bouillon tue la souris en six à sept jours. L'autopsie révèle la présence d'abcès volumineux au niveau de l'épiploon entre le foie et la rate ; le sang du cœur est virulent.

Le pouvoir pathogène pour le cobaye est faible ; l'inoculation sous-cutanée ne produit aucune lésion évolutive. L'inoculation intrapéritonéale d'une forte dose est suivie de la formation d'un abcès sur la face pariétale du péritoine, au point d'inoculation, et d'une réaction inflammatoire de l'épiploon. L'abcès disparaît en l'espace d'un mois.

De même, le lapin supporte impunément l'inoculation de doses répétées.

Il est remarquable que malgré des passages réguliers sur la souris, on observe une diminution progressive du pouvoir pathogène de la souche.

**POSITION SYSTÉMATIQUE.** — Cette bactérie peut être considérée comme appartenant au genre *Pasteurella* : c'est, en effet, une Parvobactérie immobile n'attaquant pas le lactose, faisant fermenter sans produire de gaz le glucose et le saccharose, ne liquéfiant pas la gélatine. Elle diffère cependant de *Pasteurella septica* : elle n'attaque pas la glycérine, ne produit pas d'indole, possède une uréase, résiste au moins quinze jours au froid, pousse en eau de levure. Elle diffère de *Pasteurella hemolytica* qui attaque le lactose et ne possède pas d'uréase. Ce dernier caractère la rapproche de *Pasteurella pseudotuberculosis*. Mais elle s'en écarte nettement, étant immobile à  $20^{\circ}$ , donnant une réaction douteuse avec le rhamnose, n'attaquant pas la glycérine. Elle possède de nombreux traits communs avec *Pasteurella purifaciens* (Christiansen, 1917 [4]), en particulier son activité biochimique et son pouvoir pathogène. Elle en diffère, cependant, par la morphologie des colonies à l'isolement, l'aspect de la culture en bouillon et, surtout, en eau peptonée, la fermentation sans gaz du glucose.

## SUMMARY

A NEW *Pasteurella* ISOLATED FROM PULMONARY ABCESES  
IN THE ALBINO RAT.

The author describes the character of the germ : morphology, cultural properties on various media, biochemical properties, hemolytical capacity, duration of preservation, variation S-R, pathogenicity, taxonomy.

## BIBLIOGRAPHIE

[4] CHRISTIANSEN. *Maanedsskr. Dyrlaeger*, 1917, 29, 449.

**IDENTIFICATION RAPIDE DES BACILLES  
A GRAM NÉGATIF DES URINES  
SUR MILIEU TERGITOL 7 TTC**

par R. MAGNIN et M<sup>lle</sup> H. GEORGOPOULOS.

(Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie  
de l'Université de Grenoble.

Chaire de Bactériologie et d'Hygiène [professeur SEIGNEURIN])

Le milieu tergitol 7 TTC, mis au point par Chapman [1] et adapté à la colimétrie des eaux sur membrane filtrante par Buttiaux et coll. [2] nous avait semblé intéressant pour la recherche des *E. coli* spécifiques dans les selles d'enfants atteints de gastro-entérite [3].

Nous avons utilisé ce même milieu pour la colimétrie des laits crus et pasteurisés [4]. Parallèlement, nous avons essayé de faciliter la fabrication de ce milieu en utilisant une base gélosée simple à laquelle on ajoute une quantité déterminée de solution concentrée contenant les différents constituants du milieu tergitol 7 TTC [4].

Dans la présente note, nous relatons l'application que nous avons faite de ce milieu à l'identification rapide des bacilles à Gram négatif des urines.

Ce milieu peut être utilisé soit en boîte de Petri, soit en tube incliné, en maintenant toujours les mêmes proportions de gélose nutritive et des solutions I et II.

Pour des raisons d'économie de matériel, nous avons utilisé ce milieu en tube incliné. On peut en préparer une certaine quantité d'avance, mais il est préférable de les utiliser dans les quinze jours.

Le culot de centrifugation des urines à examiner est ensemencé

systématiquement sur deux tubes, l'un de gélose nutritive ordinaire et l'autre de gélose tergitol 7 TTC ; l'ensemencement est fait de manière à obtenir des colonies isolées en haut de la tranche, par exemple en flambant l'anse au milieu de l'ensemencement et en continuant l'étalement avec l'anse flambée.

Les deux tubes sont incubés vingt-quatre heures à 37°.

RÉSULTATS. — Ils portent sur 1 500 urines provenant des malades les plus divers.

1° 1 050 urines n'ont donné aucune colonie sur les deux tubes : urine amicrobienne (mis à part le B. K. bien entendu).

2° 250 urines ont donné quelques colonies plus ou moins envahissantes sur la gélose ordinaire et pas de colonie sur tergitol 7 TTC : il s'agit le plus souvent de germes banaux qui peuvent être considérés comme des souillures, surtout si le prélèvement n'a pas été fait par sondage comme il arrive fréquemment chez l'homme.

3° 200 urines ont donné des colonies plus ou moins nombreuses sur les deux tubes. Dans ce cas nous avons isolé les différentes sortes de colonies qui ont poussé sur le milieu tergitol 7 TTC en vue de les identifier plus complètement (test IMVIC, urée, mannitol).

Parmi les 200 dernières urines qui ont donné des bacilles à Gram négatif capables de cultiver sur le milieu sélectif, 164 ne contenaient qu'un seul germe (mis à part les cocci et bacilles à Gram positif) ; 36, par contre, contenaient plusieurs sortes de bacilles à Gram négatif.

Il est intéressant de savoir si les caractères morphologiques macroscopiques des colonies peuvent donner des indications suffisantes pour l'identification des germes dans la pratique courante. A cet effet, nous avons comparé les caractères culturels sur milieu tergitol 7 TTC, aux résultats obtenus après identification par les procédés classiques, mais longs, à partir de colonies isolées sur ce milieu.

Il nous est apparu que l'on peut faire un *diagnostic de genre* avec une précision importante simplement en observant les caractères culturels après dix-huit à vingt-quatre heures d'incubation sur le milieu tergitol 7 TTC :

1° Colonies jaunes à centre orangé avec virage au jaune franc de toute la gélose : il s'agit presque toujours d'*Escherichia* et dans 95 p. 100 des cas d'*E. coli*.

2° Colonies orangées très muqueuses avec virage du milieu au jaune sale, souvent le fond du tube n'est pas viré complètement : il s'agit d'un *Aerobacter*.

3° Colonies rouge violacé avec gélose verdâtre ; il s'agit le plus souvent de *Paracoli*.

4° Colonies violettes avec virage de la gélose au bleu ; il s'agit de *Proteus* ou de *Pseudomonas*, mais ce dernier donne une pigmentation sur gélose ordinaire, ce qui le différencie facilement.

CONCLUSION. — L'utilisation combinée d'un tube de gélose ordinaire et d'un tube de gélose tergitol 7 TTC permet l'élimination facile des urines contaminées secondairement par des germes à Gram positif et

une identification sommaire très rapide des bacilles à Gram négatif. Cette identification est souvent suffisante dans la pratique courante en milieu hospitalier.

## SUMMARY

RAPID IDENTIFICATION, ON TERGITOL 7 TTC MEDIUM,  
OF GRAM NEGATIVE BACTERIA FROM URINE.

The authors use simultaneously an ordinary agar medium and a tergitol 7 TTC agar medium. This allows to easily eliminate such urines as have been secondarily contaminated by Gram positive germs and to rapidly identify the Gram negative bacteria. This identification is often sufficient in routine hospital work.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHAPMAN (G. H.). *J. Bact.*, 1947, **53**, 504 ; *Am. J. publ. Hlth*, 1951, **41**, 1381.
- [2] BUTTIAUX (R.), MUCHEMBLE (G.) et LEURS (Th.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 1010.
- [3] MAGNIN (R.). *Thèse Doct. Méd.*, Lyon, 1956.
- [4] SEIGNEURIN (R.) et MAGNIN (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 537.
- [5] CARRÈRE (L.) et SUIRE (M<sup>lle</sup> A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 187.

## AU SUJET DE L'HYDROLYSE DE L'URÉE PAR *PROTEUS VULGARIS*

par G. O. CESAIRE, H. BOIRON, M. LECOMTE et E. NEUZIL.

(Laboratoire de Biochimie médicale et Laboratoire de Bactériologie,  
Ecole de Médecine et de Pharmacie de Dakar, Dakar-Fann, A. O. F.)

L'urée est susceptible d'être hydrolysée en gaz carbonique et en ammoniac par de nombreux microorganismes dont l'équipement enzymatique comporte une uréase, cet enzyme pouvant dans certains cas prendre naissance par adaptation du germe sur des milieux à l'urée. Bien que l'activité uréolytique puisse être évaluée quantitativement en dosant l'un ou l'autre des produits de scission, les tests utilisés par les microbiologistes reposent tous sur la mise en évidence d'ions ammonium, d'une manière directe par le réactif de Nessler (Elek [1]) ou plus souvent d'une manière indirecte grâce au virage d'un indicateur coloré (rouge de phénol) qui décèle l'alcalinisation du milieu. Cette variation du pH est elle-même en rapport avec le pouvoir tampon du milieu. Lorsque le liquide nutritif est faiblement tamponné (milieu de Christensen [2] et d'Ewing [3]), une très faible



quantité d'ammoniaque suffit à entraîner le virage du colorant que l'on observe avec de nombreuses espèces bactériennes ; au contraire, les milieux possédant un fort pouvoir tampon ne peuvent être « forcés » que par une libération importante d'ammoniaque, traduction d'une uréolyse intense ; lorsque les tests sont pratiqués sur des milieux de ce dernier type, les réponses positives sont beaucoup plus rares et se limitent pratiquement à quelques mycobactéries [4] et surtout au *Proteus* [5], dont l'activité hydrolytique vis-à-vis de l'urée apparaît particulièrement importante ; le *Proteus* peut être ainsi différencié des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* [6, 7] ; la diagnose peut s'effectuer également avec des milieux faiblement tamponnés car le *Proteus* surclasse par sa vitesse d'hydrolyse les autres germes uréolytiques ; on utilise alors un temps d'observation très court [2, 3, 8].

C'est en raison de l'activité si marquée du *Proteus* sur l'urée que nous avons choisi ce germe ; nous étudions ici deux points de sa physiologie microbienne, le sort de l'ammoniaque libérée et la spécificité de son uréase.

*Techniques utilisées.* — Le milieu employé présente la composition suivante, pour 100 ml :

Urée .....	227,3 mg
Phosphate acide de potassium .....	500 mg
Sulfate neutre de potassium .....	50 mg
Glycérol .....	2 g
Citrate de magnésium .....	150 mg
Solution de microéléments [9] .....	0,1 ml

Le milieu, amené avec de la soude normale à pH = 6,8, est stérilisé par filtration et réparti, à raison de 10 ml, dans des tubes bouchés au coton. Les tubes sont ensemencés avec X gouttes d'une culture de 24 heures d'un *Proteus vulgaris* de collection ; cette culture a été elle-même obtenue, dans le milieu ci-dessus, à partir d'une anse prélevée sur gélose.

Après des temps variables d'incubation à 37° C, la culture contenue dans un tube est centrifugée et l'on prélève le liquide surnageant ; on en mesure le pH à l'électrode de verre, tandis qu'on détermine par ailleurs la présence d'ammoniaque par le réactif de Nessler et qu'on effectue la recherche des amino-acides par chromatographie, en utilisant deux systèmes de phases solvantes différents (pour les détails de technique chromatographique, voir un travail antérieur [9]) ; chaque expérience est effectuée en double. Parallèlement à ces essais, une série de tubes est additionnée de rouge de phénol dont on note le moment d'apparition du virage. Nous avons vérifié que le milieu, non ensemencé, ne subit aucune variation de pH et que, même après cinq jours d'étuve à 37° C, le réactif de Nessler ne permet pas d'y déceler d'ammoniaque.

**RÉSULTATS.** — Nos résultats sont groupés dans le tableau I.

*P. vulgaris* pousse avec facilité sur le milieu synthétique utilisé ; on remarque l'alcalinisation progressive du milieu, qui passe de pH 6,8 à pH 8,44, cette dernière valeur correspondant à la formation de 45 mg d'ammoniaque pour 100 ml du milieu ; l'hydrolyse de l'urée est donc loin d'être totale. L'activité uréolytique du *Proteus* apparaît très tôt

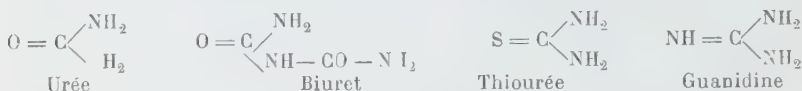
TABLEAU I.

Temps d'observation (heures)	Pousse microbienne	pH	Indicateur coloré (rouge de phénol)	Test au réactif de Nessler	Amino-acides décélés
0	0	6.80	jaune	0	0
12	+	6.93	jaune	+	0
14	+	6.99	jaune	+	0
16	+	7.05	jaune	+	0
19	+	7.15	jaune	+	0
21	+	7.19	jaune	+	0
22	+	7.22	jaune	+	0
24	++	7.24	jaune	++	0
27	++	7.26	jaune	+++	faible trainée nin- hydrine positive
30	++	7.28	jaune	+++	trainée plus nette
33	++	7.46	début de virage	+++	alanine ac. glutamique
34	++ <sub>2</sub>	7.52	début de virage	+++	alanine ac. glutamique
48	++	8.23	rouge	+++	alanine ac. glutamique
72	+++	8.34	rouge	+++	alanine ac. glutamique
120	+++	8.44	rouge	+++	alanine ac. glutamique

puisque le réactif de Nessler décèle l'ammoniaque dès la douzième heure. Ce n'est que bien après l'apparition de l'ammoniaque que l'on peut mettre en évidence sur les chromatogrammes, après la vingt-septième heure, une trainée révélable par la ninhydrine dont la situation correspond aux Rf de l'alanine et de l'acide glutamique ; les

deux acides aminés s'individualisent ensuite très nettement, vers la trente-troisième heure, dans les deux systèmes chromatographiques utilisés ; nous avons déterminé qu'à ce moment la quantité d'ammoniaque libérée est d'environ 15 mg pour 100 ml du milieu.

Nous avons effectué en outre des expériences analogues dans lesquelles l'urée était remplacée par une quantité équimoléculaire de biuret, de thiourée ou de guanidine, substances très voisines de l'urée. Avec les trois nouveaux milieux ainsi préparés, la pousse de *P. vulgaris* reste inappréciable, tandis que l'on n'observe aucune variation de pH ni d'apparition d'ammoniaque ou d'acides-amino.



*Interprétation.* — La rapidité avec laquelle l'urée est hydrolysée par *Proteus vulgaris* prouve que l'uréase de ce germe est un enzyme constitutif et que cette diastase ne se forme pas après une adaptation au milieu, comme on l'a noté pour l'uréase de certaines souches d'*Esch. intermedium* et d'*Aerobacter* [40].

L'apparition d'acides-amino se montre nettement postérieure à l'ammoniogenèse, car les sensibilités des deux réactions analytiques que nous avons utilisées, la réaction de Nessler et la réaction à la ninhydrine, apparaissent très comparables. La biosynthèse des acides-amino par *P. vulgaris* s'effectue donc aux dépens des ions ammonium lorsque ceux-ci ont atteint une concentration suffisante dans le milieu ; cela semble d'ailleurs un phénomène très général du métabolisme azoté microbien, puisque l'assimilation de l'azote moléculaire comme celle des ions nitrate implique également la transformation préalable en ions ammonium [41].

Les seuls acides-amino décelés dans le liquide de culture, même après cinq jours d'incubation, sont l'alanine et l'acide glutamique. Nos résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Jones et Holtman [42] avec *Salmonella pullorum*, qui montrent également l'apparition de ces deux acides-amino ; toutefois, le milieu utilisé par ces auteurs apparaît plus complexe que le nôtre et, en plus d'un sel d'ammonium, renferme déjà de l'azote  $\alpha$ -aminé sous forme de DL-thréonine. La nature même des deux acides-amino mis en évidence dans nos essais nous conduit à admettre leur synthèse simultanée par une réaction d'amination réductrice de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique (par une L-glutamodéhydrase) et de l'acide pyruvique (par une L-acidaminodéhydrase) ; ces acides  $\alpha$ -cétoniques se formeraient au cours du cycle tricarboxylique dont on connaît l'existence chez de nombreuses bactéries [43] ; il est également possible d'invoquer la synthèse première de l'acide glutamique à partir de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique suivie d'une transamination sur l'acide pyruvique qui donne naissance à l'alanine ; il ne nous a pas été possible de préciser l'antériorité d'apparition de l'acide glutamique, notée par Jones et Holtman (*loc. cit.*). Les deux hypothèses nécessitent la présence de coenzymes vitaminiques (phosphoriboflavine pour la L-acidaminodéhydrase, DPN pour la L-glutamodéhydrase, phospho-5-pyridoxal pour la transaminase) que nous

n'avons pas introduits dans notre milieu synthétique ; la concentration de ces coenzymes, apportés par l'inoculum ou synthétisés au cours de la croissance microbienne, doit être extrêmement faible, ce qui explique que toute l'ammoniaque libérée n'est pas utilisée pour la biosynthèse d'acides aminés ; la base azotée continue en effet à s'accumuler dans le milieu de culture, alors que les amino-acides sont décelables sur les chromatogrammes. Nous continuons ce travail en vue de préciser le mécanisme de la biosynthèse des acides aminés.

Nous avons noté antérieurement des résultats voisins avec *Ps. aeruginosa* [9], qui se montre également capable d'effectuer la synthèse d'amino-acides sur un milieu dont l'urée constitue le seul élément azoté : les acides aminés décelables dans le milieu de culture sont cependant plus nombreux avec le pyocyanique.

Les essais rapportés ci-dessus montrent que l'activité uréolytique de *Proteus vulgaris* est étroitement spécifique ; c'est d'ailleurs ce que l'on observe avec des préparations cristallines d'uréase [14] ; les expériences d'Uttjino et coll. [15] concernant l'hydrolyse du biuret par diverses espèces microbiennes possédant une uréase, mériteraient d'être reprises, car les préparations commerciales les plus pures de biuret renferment parfois de petites quantités d'urée [16, 17].

RÉSUMÉ. — *Proteus vulgaris* se développe facilement sur un milieu synthétique dont l'urée constitue l'unique source azotée. La libération d'ammoniaque est suivie de la biosynthèse d'alanine et d'acide glutamique. La spécificité de l'activité uréolytique du germe apparaît absolue.

#### SUMMARY

##### STUDIES ON UREA HYDROLYSIS BY *Proteus vulgaris*.

*Proteus vulgaris* easily grows on a synthetic medium containing urea as exclusive nitrogen source. The release of ammoniac is followed by biosynthesis of alanin and glutamic acid. The ureolytic activity of *Proteus vulgaris* is narrowly specific.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ELEK (S. D.). *J. Path. Bact.*, 1948, **60**, 183.
- [2] CHRISTENSEN (W. B.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 461.
- [3] EWING (W. H.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 433.
- [4] TACQUET (A.), GERNEZ-RIEUX (C.) et GAUDIER (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 335.
- [5] STUART (C. A.), STRATUM (E. VAN) et RUSTIGIAN (R.). *J. Bact.*, 1945, **49**, 437.
- [6] RUSTIGIAN (R.) et STUART (C. A.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1943, **53**, 241.
- [7] FERGUSON (W. W.) et HOOK (A. E.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1943, **28**, 1715.
- [8] EWING (W. H.) et BRUNER (D. W.). *Am. J. clin. Path.*, 1947, **17**, 1.
- [9] CÉSaire (G.-O.), NEUZIL (E.), BOIRON (H.) et LECOMTE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1957 (à paraître).
- [10] OLITZKI (L.) et DRIMMER-HERRNHEISER (H.). *V<sup>e</sup> Congr. Intern. Microbiol.* (résumé comm.), Rio-de-Janeiro, 1950, p. 33.

- [11] FRY (B. A.). *The nitrogen metabolism of micro-organisms*. 1 vol., 166 p., Methuen et Co Ltd, édit., Londres, 1955, p. 60.
- [12] JONES (A. W. Jr) et HOLTMAN (D. F.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 147.
- [13] KREBS (H. A.), in GREENBERG (M.). *Chemical pathways of metabolism*. 2 vol., Academic Press, New York, 1954, **1**, 109.
- [14] SUMNER (J. B.), in SUMNER (J. B.) et MYRBACK (K.). *The Enzymes*. 4 vol., Academic Press, New York, 1951, **1**, 2<sup>e</sup> partie, 873.
- [15] UTTIHO (S.), IMAIZUMI (M.) et NAKAYAMA (M.). *J. Biochem. (Japan)*, 1938, **27**, 257.
- [16] SHAW (W. H. R.) et KISTIAKOWSKY (G. B.). *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72**, 634.
- [17] SHAW (W. H. R.) et KISTIAKOWSKY (G. B.). *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72**, 2817.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**De l'action antituberculeuse de la streptovaricine *in vitro* et *in vivo* chez le cobaye (prévention),** par A. LUTZ et M. A. WITZ.

**Etudes sur le collagène. XII. Action de divers polyosides (y compris des polyosides bactériens) sur du collagène natif (collagène de tendon),** par S. BAZIN et A. DELAUNAY.

**Activité *in vitro* de la spiramycine en association avec la tétracycline, l'érythromycine, la pénicilline, la streptomycine, sur la multiplication de *Staphylococcus aureus*, étudiée au microbiophotomètre,** par N. MATHIEU et M. FAGUET.

**Recherches sur la morphologie des Leptospires à l'aide du microscope électronique,** par A. A. VARPHOLOMEEVA et E. A. STANISLAVSKY.

**La multiplication du virus rabique dans un astrocytome transmissible chez la souris,** par H. A. PEARSON, P. ATANASIU et P. LÉPINE.

**L'« effet oxygène » dans l'irradiation X de microorganismes déficients en enzymes de la respiration aérobie,** par E. MOUSTACCHI.

**Les bactéries de la flore fécale de la vache saine,** par A. WILSSENS et R. BUTTIAUX.



## AVIS

INSTITUT DE TECHNIQUE SANITAIRE.  
CONSERVATOIRE DES ARTS ET METIERS.

Le programme des cours est réparti sur deux années scolaires. Il a pour sanction le brevet de technicien sanitaire.

L'Institut de Technique Sanitaire a été créé en 1923, mais les problèmes de l'hygiène urbaine prennent une importance accrue qui met cette technique au premier plan.

Renseignements au Conservatoire des Arts et Métiers, 292, rue Saint-Martin, Paris, 3<sup>e</sup>.

## LIVRES REÇUS

P. Cazal. — *Erythrocytes et érythropathies*. 1 vol., 628 p., 153 fig., 48 tableaux, Masson, édit., Paris, 1957. Prix : broché : 4 200 fr., cartonné toile : 5 000 fr.

Ce nouvel ouvrage s'inscrit dans la série que l'auteur s'est proposé de consacrer à l'ensemble de l'hématologie et dont un premier volume sur « La masse sanguine et sa pathologie » a déjà paru. Ce sont, cette fois, les globules rouges que l'auteur étudie.

Les quatre premiers chapitres ont trait aux caractères généraux des érythrocytes et des cellules qui leur donnent naissance. Le tissu érythropoïétique médullaire et sa population globulaire adulte constitue un des plus volumineux organes du corps. Il est étudié sous ses divers aspects : cytologique, physico-chimique, physiologique et biométrique. Les dix chapitres suivants sont consacrés à la pathologie érythrocytaire. Les érythropathies sont classées selon une base physiopathologique. Leur présentation fait une large part à l'analyse de laboratoire, étant donné les nombreuses acquisitions récentes, techniques et appareils nouveaux, dans ce domaine.

H. T.

*Report of the Medical Research Council for the year 1955-1956. Committee of Privy Council for medical Research.* Her Majesty's Stationery Office, édit., Londres, 1957. Prix : 9 shillings.

A. Meister. — *Biochemistry of the amino acids*. 1 vol., 485 p., Academic Press Inc., édit., New York, 1957. Prix : \$ 10,00.

L'ouvrage est divisé en cinq chapitres, comportant chacun sa bibliographie. Le premier étudie les acides aminés qui se rencontrent dans la nature et les formes sous lesquelles ils ont été trouvés ; on insiste sur leurs propriétés générales y compris, en particulier, leur formule stéréochimique, qui joue un grand rôle en biologie. Le second chapitre

envisage le rôle des acides aminés dans la nutrition. Les troisième et quatrième résument l'état actuel de nos connaissances sur le métabolisme de ces acides, leur synthèse et leur dégradation, et les rapports entre acides aminés et autres métabolites. Un dernier chapitre enfin expose leur métabolisme normal et les anomalies qui accompagnent certains états pathologiques.

H. T.

**E. J. Conway.** — *Microdiffusion analysis and volumetric error*. 4<sup>e</sup> édit. 1 vol., 465 p., 79 fig., Crosby Lockwood and sons édit., Londres, 1957. Prix : 42 shillings.

Dans cette 4<sup>e</sup> édition, l'auteur attire l'attention sur quelques aspects nouveaux qu'a revêtus la question au cours des récentes années. Les techniques et les appareils nouveaux sont décrits et de nombreuses illustrations aident à l'intelligence du texte.

H. T.

*Ciba Foundation. Colloquia on Endocrinology. Vol. XI. Hormones in blood.* 1 vol., 416 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1957. Prix : 56 shillings.

Depuis la découverte des hormones, définies d'abord comme des substances transportées par le sang jusqu'à l'organe sensible, on a surtout étudié leurs fractions excrétées dans l'urine. Le présent Colloque, dans son ensemble, est un essai de revenir à l'étude des hormones dans le sang, c'est-à-dire un retour à la voie normale des recherches. Il comprend de nombreuses communications, qui passent en revue toutes les hormones actuellement connues, leurs effets et les inhibiteurs de ces effets.

H. T.

**Houben Weyl.** — *Methoden der organischen Chemie*. 4<sup>e</sup> édition complètement remise à jour, tome XI, vol. 1 : Composés azotés. Préparation des amines. 1 224 pages. Georg Thieme, Stuttgart, édit., 1957. Prix : D. M. 208.

La publication des *Methoden der organischen Chemie* de Houben Weyl se poursuit avec la mise en vente de la première partie du tome XI. Cette nouvelle réjouira les nombreux utilisateurs de cet excellent ouvrage qui s'inquiétaient de l'irrégularité et de la lenteur de sa parution.

Le tome XI devait être primitivement consacré à la préparation et aux transformations des amines, des lactames, des sels d'ammonium quaternaire et des composés à la fois azotés et soufrés. Il a dû être scindé en deux volumes en raison de l'abondance des matières à traiter. Le premier volume, dont nous rendons compte ici, est consacré à la préparation des amines. Il a été rédigé par une équipe de chimistes des Etablissements Bayer ; on y retrouve les qualités qui ont fait le succès des ouvrages précédemment parus dans cette série : une bibliographie très complète, s'arrêtant en 1956 et une présentation impeccable, digne de la tradition des Editions Thieme. Ce volume connaîtra sans aucun doute auprès des chimistes le succès des volumes précédents.

P. K.

# TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 93

## Notices nécrologiques.

† P. FORGEOT (1878-1957) . . . . .	405
† A. ASCOLI (1877-1957) . . . . .	681

AKSEL (I. S.) et AYKAN (T. B.). — Le comportement en culture du tissu cérébral infecté par le virus rabique. L'évolution des corpuscules de Negri . . . . .	30
ANDERSON (T. F.) et MAZÉ (R.). — Analyse de la descendance des zygotes formés par conjugaison chez <i>E. coli</i> K12 . . . . .	194
— WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). — Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez <i>E. coli</i> . III. Aspects morphologiques en microscopie électronique . . . . .	450
ANDRAL (L.) et SERIÉ (Ch.). — Etudes expérimentales sur la rage en Ethiopie . . . . .	475
ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — Cytochrome et activité cytochrome-oxydasique des Mycobactéries sensibles et résistantes à l'INH . . . . .	281
— et TACQUET (A.). — Métabolisme des Mycobactéries sensibles et résistantes à l'INH. Activité amino-oxydasique (production d'eau oxygénée) . . . . .	695
ANDRIEU (G.), ENJALBERT (L.), LAPCHING (L.) et DIDIER (J.). — Recherche des anticorps du groupe APC . . . . .	421
ATANASIU (P.). — Voir BOURDIN (P.).	
AUDRIN (J.) et DEGOMMIER (J.). — Utilisation en pratique courante d'une méthode de coloration des b. tuberculeux pour la recherche en fluorescence . . . . .	413
AYKAN (T. B.). — Voir AKSEL (I. S.).	
BARBU (E.). — Voir PANIJEL (J.).	
BARDÉTY (M.), GAJDOS (A.), GAJDOS-TOROK (M.) et SIFFERLEN (J.). — Signification et nature des porphyrines synthétisées par les b. tuberculeux et paratuberculeux . . . . .	553
BARJAC (H. DE) et POCHON (J.). — Equilibre climacique et minéralisation humique . . . . .	517
BARSKI (G.). — Position particulière des encéphalomyélites de type Mengo par rapport aux poliomyélites. Données cytopathologiques <i>in vitro</i> . . . . .	142

- BASSET (J.). — Action des hautes pressions sur les virus. Variation avec la température de la pression d'inactivation de certains virus . . . . . 69
- Voir HIRTH (L.).
- BAZIN (S.) et DELAUNAY (A.). — Etudes sur le collagène. XI. Examen quantitatif des combinaisons *in vitro* collagène A-mucopolysaccharides acides . . . . . 624
- BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). — Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1955 . . . . . 300
- BERTRAND (P.). — Voir GODFRAIN (J.-C.).
- BEUMER (J.), BEUMER-JOCHMANS (M. P.) et DIRKX (J.). — Recherches sur le rôle des cations dans la fixation des bactériophages sur les bactéries sensibles. I. Influence de la concentration en cations sur la fixation d'un bactériophage sur différentes souches sensibles . . . . . 36
- Voir DIRKX (J.).
- BEUMER-JOCHMANS (M. P.). — Voir BEUMER (J.).
- Voir DIRKX (J.).
- BIOT (N.). — Voir VIALIER (J.).
- BOIRON (H.). — Voir CÉSAIRE (G.-O.).
- BOURDET (M.). — Voir CHAMBON (L.).
- BOURDIN (P.), ATANASIU (P.), LÉPINE (P.), JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). — Culture du virus de Teschen sur cellules épithéliales de rein de porc en couche monocellulaire . . . . . 581
- BRETEY (J.), LEVADITI (J. C.) et PICK (F.). — Grains entourés de massues et macrophages englobant des amas de bacilles acido-résistants réalisés au laboratoire avec *M. tuberculosis*. 123
- Voir COLETOS (P. J.).
- BRION (G. DE). — Voir VIEUCHANGE (J.).
- BRISOU (J.). — Contribution à l'étude de la systématique des *Pseudomonadaceae* . . . . . 397
- BUCK (G.) et SERRES (H.). — Etude de la virulence des centres nerveux de porcelets inoculés de virus de Teschen (souche malgache) . . . . . 230
- CAPOCACCIA (L.). — Voir ORTALI (V.).
- CARRÈRE (L.), ROUX (J.) et SUIRE (A.). — Obtention d'un milieu sélectif pour l'isolement des *Brucella* en produits contaminés . . . . . 131
- CAYRÉ (R.-M.). — Voir VIALIER (J.).
- CÉSAIRE (G.-O.), BOIRON (H.), LECOMTE (M.) et NEUZIL (E.). — Au sujet de l'hydrolyse de l'urée par *Proteus vulgaris* . . . . . 805
- CHABBERT (Y.). — Une technique nouvelle d'étude de l'action bactéricide des associations d'antibiotiques : le transfert sur cellophane . . . . . 289
- CHAMBON (L.), STAUB (A. M.) et BOURDET (M.). — Constitution antigénique de *Malleomyces pseudomallei*. III. Mode d'extrac-

tion et premiers essais de purification de l'antigène d'enveloppe K . . . . .	376
CHARDONNET (Y.). — Voir PRUNIÉRAS (M.).	
CHEVALLIER (M.-R.). — Voir LUZZATI (D.).	
CHEVÉ (J.). — Voir GALLUT (J.).	
CHEVRIER (L.). — Voir PLACIDI (L.).	
CHODKOWSKI (A.) et PARNAS (J.). — Etude des souches de <i>Brucella</i> isolées en Pologne . . . . .	266
COLETSOS (P. J.), ORIOR (E.) et REGEL (N. DE). — Etude de la sensibilité de <i>M. tuberculosis</i> à la cyclosérine et méthode de titrage <i>in vitro</i> . . . . .	21
— ORIOR (E.) et REGEL (N. DE). — Etude de la sensibilité de <i>M. tuberculosis</i> à la viomycine et méthode de titrage <i>in vitro</i> . . . . .	210
— BRETEY (J.), LAROCHE (M.-J.), ORIOR (E.) et REGEL (N. DE). — Répartition de la cyclosérine dans le sérum et les viscères chez le chimpanzé, le rhésus, le cynocéphale, le papion, le lapin, le cobaye et la poule . . . . .	563
COLOBERT (L.) et ROCQUET (G.). — Position taxonomique de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> et de <i>Coccus P.</i> Caractère contingent de la sécrétion de protéinase chez certaines espèces du genre <i>Sarcina</i> . . . . .	663
COSTER (J. F.) et VINK (H. H.). — Détermination de Mycobactéries au moyen de l'œil du lapin . . . . .	795
CROISSANT (O.). — Voir HIRTH (L.).	
DANIEL (Ph.), SLIZEWICZ (P.) et LÉPINE (P.). — Effet des produits d'hydrolyse enzymatique du sérum de poulain sur la croissance des cellules de la souche HeLa . . . . .	766
DAOULAS-LE BOURDELLÈS (F.). — Voir SAINT-PAUL (M.).	
DEGOMMIER (J.). — Voir AUDRIN (J.).	
DELAUNAY (A.). — Voir BAZIN (S.).	
DESCHIENS (R.). — Les facteurs conditionnant l'habitat des mollusques vecteurs des bilharzioses. III et IV . . . . .	1 et 153
DIDIER (J.). — Voir ANDRIEU (G.).	
DIGEON (M.) et RAYNAUD (M.). — Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique. VI. Action toxique expérimentale. C. et D. . . . .	91 et 390
DIRKX (J.), BEUMER (J.) et BEUMER-JOCHMANS (M. P.). — Recherches sur le rôle des cations dans la fixation des bactériophages sur les bactéries sensibles. II. Etude physico-chimique. . . . .	168 et 340
— Voir BEUMER (J.).	
DROUHET (E.) et SIMONNET (G.). — Candidose digestive chez le lapin. . . . .	237
— et WILKINSON (R.). — Activité thérapeutique de l'amphotéricine B dans la blastomycose expérimentale . . . . .	631
DROUHET (V.). — Etude d'un virus APC isolé d'un cas de pneumopathie mortelle . . . . .	138



- ENJALBERT (L.). — Voir ANDRIEU (G.).
- FINE (J.-M.). — Apport des méthodes immunologiques récentes au problème de l'identification du sang humain . . . . . 592
- FUERST (C. R.). — Voir JACOB (F.).
- GAJDOS (A.). — Voir BARIÉTY (M.).
- GAJDOS-TOROK (M.). — Voir BARIÉTY (M.).
- GALLUT (J.). — Essais d'exaltation du pouvoir toxique de *Vibrio cholerae*. I et II . . . . . 406 et 532
- CHEVÉ (J.) et GAUTHIER (J.). — Etude immuno-chimique de vingt vibrions provenant d'avortements bovins. Comparaison avec deux souches de *Vibrio fœtus* . . . . . 683
- GAUTHIER (J.). — Voir GALLUT (J.).
- GEORGOPOULOS (H.). — Voir MAGNIN (R.).
- GÉRARD (A.). — Voir GERNEZ-RIEUX (Ch.).
- GÉRARD (S.). — Voir MUTERMILCH (S.).
- GERNEZ-RIEUX (Ch.), GÉRARD (A.) et TACQUET (A.). — Influence de l'administration orale de BCG résistant à l'isoniazide sur l'infection tuberculeuse expérimentale du lapin . . . . . 545
- Voir ANDREJEV (A.).
- GODFRAIN (J.-C.), BERTRAND (P.) et LIANDIER (L.). — Recherche et essai de dosage de l'aldéhyde formique dans les milieux biologiques, anatoxines, sérums, vaccins . . . . . 525
- GOURDON (J.-M.). — Voir GOURDON (R.).
- GOURDON (R.), GOURDON (J.-M.), HENRY (M.) et QUINCHON (Cl.). — Recherches sur *Pasteurella septica*. Etude bactériologique des souches isolées d'animaux des espèces porcine et ovine. 251
- GRUEST (J.). — Voir VIEUCHANGE (J.).
- GUELIN (A.) et LÉPINE (P.). — Le rôle des ions sodium ( $^{24}\text{Na}$ ) au cours de la fixation du bactériophage sur les bactéries. 719
- GUILLLOT (P.). — Culture du virus de la fièvre aphteuse (type O) en cultures de tissus de reins de porcs. I. Etude de l'infectivité. . . . . 81
- HAUDUROY (P.) et WACHSMUTH (Cl.). — Démonstration directe de l'hétérogénéité des souches de b. tuberculeux vis-à-vis des isoniazides . . . . . 276
- HENRY (M.). — Voir GOURDON (R.).
- HINGLAIS (H.). — Voir LANGLADE (H.).
- HINGLAIS (M.). — Voir LANGLADE (H.).
- HIRSCH (M. L.). — Analyse de l'inhibition de la croissance de mutants auxotrophes d'*E. coli* exigeant l'homosérine par l'acide  $\alpha$ -amino- $\delta$ -hydroxyvalérianique . . . . . 199
- HIRTH (L.), BASSET (J.) et CROISSANT (O.). — Structure et propriétés des particules élémentaires du virus de la mosaïque du tabac. I. Résultats préliminaires obtenus au moyen des hautes pressions . . . . . 309

- HOFFERER (M. J.). — Voir LUTZ (A.).
- HUPPERT (J.). — Voir PANIHEL (J.).
- JACOB (F.), FUERST (C. R.) et WOLLMAN (E. L.). — Recherches sur les bactéries lysogènes défectives. II. Les types physiologiques liés aux mutations du prophage . . . . . 724  
 — Voir ANDERSON (T. F.).  
 — Voir WOLLMAN (E. L.).
- JACOB (J.). — Voir SAINT-PAUL (M.).
- JACOTOT (H.). — Voir BOURDIN (P.).
- JANOK (J.), NIZNANSKY (F.) et KREMERY (V.). — Détermination électrométrique de l'activité lipasique des souches de *Brucella*. 257
- KAISER (P.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- KAMINSKI (M.). — Etude immunochimique et électrophorétique des globulines du blanc d'œuf. II. Dénombrement et propriétés . . . . . 102
- KIRSCH (P.). — La rage humaine au Nord-Vietnam en 1955 . . 135  
 — Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur de Hanoï en 1955 . . . . . 304
- KREMERY (V.). — Voir JANOK (J.).
- LANGLADE (H.), HINGLAIS (H.) et HINGLAIS (M.). — Etude du pouvoir microbicide de la gelée royale sur le bacille de Koch. Essai de fractionnement du principe actif . . . . . 272
- LAPCHINE (L.). — Voir ANDRIEU (G.).
- L'ROCHE (M.-J.). — Voir COLETOS (P. J.).
- LEBRUN (J.). — L'antigène poliomyélitique au cours du développement intracellulaire du virus . . . . . 225
- LE CLERC (J.). — L'action de la ribonucléase sur la multiplication du virus de la grippe . . . . . 772
- LECOMTE (M.). — Voir CÉSAIRE (G.-O.).
- LEFROU (G.) et MICHARD (V.). — Etude sur les causes de mortalité des chimpanzés en captivité à l'Institut Pasteur de Kindia (1950-1956) . . . . . 502
- LÉPINE (P.). — Voir BOURDIN (P.).  
 — Voir DANIEL (Ph.).  
 — Voir GUELIN (A.).
- LEVADITI (J. C.). — Voir BRETEY (J.).  
 — Voir VALLÉE (A.).
- LÉVY (M.-M.). — Voir NORA (G.).
- LIANDIER (L.). — Voir GODFRAIN (J.-C.).
- LIEB (M.). — Participation of a non-temperate phage in lysogenization . . . . . 52
- LUCASSE (C.). — Voir OYE (E. van).
- LUTZ (A.) et HOFFERER (M. J.). — Recherches sur l'évolution de la résistance des Entérocoques aux antibiotiques usuels de 1950 à 1956. I et II . . . . . 616 et 705

- LUZZATI (D.) et CHEVALLIER (M.-R.). — Comparaison entre l'action létale et mutagène d'un peroxyde organique et des radiations sur *E. coli* . . . . . 366
- MAGNIN (R.) et GEORGOPOULOS (H.). — Identification rapide des bacilles à Gram négatif des urines sur milieu Tergitol 7 TTC . . . . . 803
- Voir SEIGNEURIN (R.).
- MALGRAS (J.), MEYER (J.) et PAX (R.). — Mise au point des techniques de dosage microbiologique des vitamines B<sub>3</sub> et B<sub>5</sub>. 732
- MARCOVICH (H.). — Sur le mécanisme de l'activité radioprotectrice de la cystéamine chez les bactéries . . . . . 456
- MARSELOU (U.). — Voir PAVLATOU (M.).
- MAZÉ (R.). — Voir ANDERSON (T. F.).
- MEYER (J.). — Voir MALGRAS (J.).
- MICHARD (V.). — Voir LEFROU (G.).
- MOUREAU (M.). — Recherches biochimiques sur les tréponèmes anaérobies. III. Détermination des acides volatils de fermentation par la méthode chromatographique de Guillaume . . . . . 656
- MOUSTARDIER (G.), PAUTRIZEL (R.), TASEI (L.) et PERETTI (J.-P. DE). — L'antigénothérapie spécifique dans le traitement des staphylococcies rebelles et récidivantes . . . . . 13
- MUTERMILCH (S.) et GÉRARD (S.). — Action de divers antibiotiques sur le tréponème de Reiter. Test d'activité possible de ces antibiotiques dans la syphilis . . . . . 435
- MUTSAARS (W.). — La réactivation multiple homologue et hétérologue du bactériophage inactivé par voie physique et chimique . . . . . 754
- NEUZIL (E.). — Voir CÉSAIRE (G.-O.).
- NIZNANSKI (F.). — Voir JANOK (J.).
- NORA (G.), LÉVY (M.-M.) et SANDOR (G.). — Etude du sérum d'un sujet atteint d'hyperlipémie essentielle . . . . . 263
- ORIOI (O.). — Voir COLETOS (P. J.).
- ORTALI (V.) et CAPOCACCIA (L.). — Position taxonomique de *Micrococcus (Coccobacillus) mycetoides* Castellani 1942, agent étiologique de l'ulcère tropicaloïde (ulcère de Castellani). 786
- OYE (E. VAN) et LUCASSE (C.). — Un nouveau sérotype du groupe *Salmonella* isolé au Congo belge : *S. businga* . . . . . 791
- PANIEL (J.) et HUPPERT (J.). — Mise en évidence de prolésines endogènes dans les bactériophages . . . . . 352
- HUPPERT (J.) et BARBU (E.). — Effets de la congélation sur les bactériophages . . . . . 183
- PARNAS (J.). — Voir CHODKOWSKI (A.).
- PAUTRIZEL (R.). — Voir MOUSTARDIER (G.).

- PAVLATOU (M.) et MARSELOU (U.). — Sur le rôle de la bile dans le milieu PCB. Autres substances qui favorisent la production de chlamydospores par *C. albicans* . . . . . 146
- PAX (R.). — Voir MALGRAS (J.).
- PERETTI (J. P. DE). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- PICK (F.). — Voir BRETEY (J.).
- PIÉCHAUD (D.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN (S.).
- PLACIDI (L.) et CHEVRIER (L.). — Réaction du hérisson à l'inoculation du virus rabique et notamment de la souche Flury. 489
- POCHON (J.). — Voir BARJAC (H. DE).
- PRÉVOT (A.-R.), THOUVENOT (H.) et KAISER (P.). — Etude de douze souches anaérobies pectinolytiques de l'intestin des poissons et des boues d'eau douce et salée . . . . . 429
- PRUNIÉRAS (M.), CHARDONNET (Y.) et SOHIER (R.). — Sur les lésions cellulaires provoquées par les adénovirus 7 et 7a . . . . . 798
- QUINCHON (Cl.). — Voir GOURDON (R.).
- RADEJ (N.). — Voir SIBALIC (S.).
- RAYNAUD (M.). — Voir RELYVELD (E. H.).  
— Voir DIGEON (M.).
- REGEL (N. DE). — Voir COLETSOS (P. J.).
- RELYVELD (E. H.) et RAYNAUD (M.). — Influence de la nature électrophorétique ( $\gamma$  ou  $\beta$ -globuline) de l'antitoxine antidiphtérique de cheval sur la forme de la courbe de précipitation quantitative . . . . . 246
- RENOUX (G.). — Voir SACQUET (E.).
- ROCQUET (G.). — Voir COLOBERT (L.).
- ROUX (J.). — Voir CARRÈRE (L.).
- SACQUET (E.). — Une *Pasteurella* nouvelle isolée d'abcès pulmonaires du rat blanc . . . . . 800  
— et RENOUX (G.). — Une souche atypique de *Brucella* isolée d'une chèvre vaccinée par vaccin vivant . . . . . 263
- SAINT-PAUL (M.), DOUALAS-LE BOURDEILLES (F.) et JACOB (J.). — Etude de l'activité immunologique des extraits de *Phaseolus vulgaris* . . . . . 602
- SANDOR (G.). — Voir NORA (G.).
- SEIGNEURIN (R.) et MAGNIN (R.). — Utilisation du milieu Tergitol 7 TTC pour la colimétrie des laits crus et pasteurisés. 537
- SÉRTÉ (Ch.). — Voir ANDRAL (L.).
- SERRES (H.). — Voir BUCK (G.).
- SIBALIC (S.) et RADEJ (N.). — Un nouveau milieu de culture pour le dosage microbiologique de la méthionine . . . . . 671
- SIFFERLEN (G.). — Voir BARIÉTY (M.).
- SIMONNET (G.). — Voir DROUHET (E.).
- SLIZEWICZ (P.). — Voir DANIEL (Ph.).
- SOHIER (R.). — Voir PRUNIÉRAS (M.).
- STAUB (A. M.). — Voir CHAMBON (L.).

- STRAPATSAKI-COCOVINI (Z.). — Etude du type fermentaire des *Corynebacterium* anaérobies par chromatographie sur papier. . . 647
- SUIRE (A.). — Voir CARRÈRE (L.).
- SZTURM-RUBINSTEN (S.), PIÉCHAUD (D.) et THIBAUT (P.). — Inoculation conjonctivale au cobaye de bacilles dysentériques . . . 463
- TACQUET (A.). — Voir ANDREJEW (A.).  
— Voir GERNEZ-RIEUX (Ch.).
- TASEI (L.). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- THIBAUT (P.). — Voir SZTURM-RUBINSTEN (S.).
- THOUVENOT (H.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- VALLÉE (A.) et LEVADITI (J.-C.). — Abscès miliaires des reins observés chez le rat blanc et provoqués par un *Corynebacterium* aérobie du type *C. kutscheri* . . . . . 468  
— Voir BOURDIN (P.).
- VIALAT (Ch.). — Voir BÉQUIGNON (R.).
- VIALIER (J.). — Apparition tardive de colonies de b. tuberculeux sur les milieux ensemencés avec des produits pathologiques traités . . . . . 410  
— CAYRÉ (R.-M.) et BIOT (N.). — Sensibilité et résistance du b. tuberculeux à la cyclosérine. Etude de 115 souches isolées de produits pathologiques humains . . . . . 127
- VIEUCHANGE (J.), BRION (G. DE) et GRUEST (J.). — De l'action cytopathogène du virus vaccinal en culture de tissus et de l'hypothèse d'un effet cytotoxique . . . . . 218
- VINCENT (P.). — Un milieu de survie pour les tréponèmes pâles, utilisable pour le test de Nelson . . . . . 539
- VINK (H. H.). — Voir COSTER (J. F.).
- WACHSMUTH (Cl.). — Voir HAUDUROY (P.).
- WILKINSON (R.). — Voir DROUHET (E.).
- WOLLMAN (E. L.) et JACOB (F.). — Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *E. coli*. La localisation chromosomique du prophage  $\lambda$  et les conséquences génétiques de l'induction zygotique . . . . . 323  
— Voir ANDERSON (T. F.).  
— Voir JACOB (F.).



# TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 93

<i>Adénovirus (APC)</i> . Etude d'un virus APC isolé d'un cas de pneumopathie mortelle . . . . .	138
— Recherche des anticorps du groupe APC . . . . .	421
— Lésions cellulaires provoquées par les — 7 et 7a. . . . .	798
<i>Aldéhyde formique</i> . Dosage de l'— dans les milieux biologiques, anatoxines, sérums, vaccins . . . . .	525
<i>Amphotéricine</i> . Voir <i>Blastomycose</i> .	
<i>Anaérobies</i> . — pectinolytiques de l'intestin des poissons et des boues d'eau douce et salée . . . . .	429
— Voir aussi <i>Corynebacterium</i> .	
<i>Antibiotiques</i> . Technique nouvelle d'étude de l'action des associations d'— : le transfert sur cellophane . . . . .	289
— Evolution de la résistance des Entérocoques aux — usuels de 1950 à 1956. I et II . . . . .	616 et 705
— Voir aussi aux différents antibiotiques.	
<i>Anti-métabolites</i> . Inhibition de la croissance de mutants d' <i>E. coli</i> par l'acide alpha-amino-delta-hydroxy-valérianique . . . . .	199
<i>BCG</i> . Influence de l'administration orale de — INH-résistant sur l'infection tuberculeuse expérimentale du lapin . . . . .	545
<i>B. paratuberculeux</i> . Voir <i>B. tuberculeux</i> .	
<i>B. tuberculeux</i> . Sensibilité à la cyclosérine et méthode de titrage <i>in vitro</i> . . . . .	21
— Grains entourés de massues et macrophages enveloppant des bacilles acido-résistants réalisés au laboratoire avec le — — . . . . .	123
— Sensibilité et résistance à la cyclosérine . . . . .	127
— Sensibilité à la viomycine et méthode de titrage <i>in vitro</i> . . . . .	210
— Hétérogénéité des souches de — — vis-à-vis des isoniazides . . . . .	276
— Apparition tardive de colonies sur les milieux ensemencés avec des produits pathologiques traités . . . . .	410
— Nouvelle méthode de coloration des — — pour la recherche en fluorescence. . . . .	413
— Signification et nature des porphyrines synthétisées par les — — et paratuberculeux . . . . .	553
<i>Bactériophage</i> . Rôle des cations dans la fixation des — sur les bactéries. I. Influence de la concentration en cations . . . . .	36
II. Etude physico-chimique . . . . .	168 et 340
— Participation d'un phage non tempéré à la lysogénisation . . . . .	52

— Effet de la congélation sur les — . . . . .	183
— Mise en évidence de polysynes endogènes . . . . .	352
— Rôle des ions Na au cours de la fixation . . . . .	719
— Réactivation multiple homologue et hétérologue du — inactivé par voie physique et chimique . . . . .	754
— Voir aussi <i>Conjugaison des bactéries</i> .	
<i>Bilharzioses</i> . Facteurs conditionnant l'habitat des mollusques vec- teurs. III et IV . . . . .	1 et 153
<i>Blastomycose</i> . Activité thérapeutique de l'amphotéricine B dans la — expérimentale . . . . .	631
<i>Brucella</i> . Milieu sélectif pour l'isolement en produits contaminés. . . . .	131
— Détermination électrométrique de l'activité lipasique des souches de — . . . . .	257
— Une souche atypique isolée d'une chèvre vaccinée par un vaccin vivant . . . . .	263
— Etude des souches isolées en Pologne . . . . .	266
<i>Champignons</i> . Rôle de la bile et autres substances favorisant la production de chlamydospores par <i>C. albicans</i> en milieu PCB. . . . .	146
— Candidose digestive chez le lapin . . . . .	237
<i>Chimpanzé</i> . Causes de mortalité des — à l'Institut Pasteur de Kindia . . . . .	502
<i>Colimétrie</i> . Utilisation du milieu Tergitol 7 TTC pour la — du lait . . . . .	537
<i>Collagène</i> . Examens quantitatifs des combinaisons <i>in vitro</i> colla- gène A-mucopolysaccharides acides . . . . .	624
<i>Conjugaison des bactéries</i> . Analyse de la descendance des zygotes formés par — chez <i>E. coli</i> K12 . . . . .	94
— Localisation chromosomique du prophage et conséquences géné- tiques de l'induction zygotique . . . . .	323
— Aspects morphologiques de la — au microscope électronique. . . . .	450
<i>Corynebacterium</i> . Abscès miliaires des reins chez le rat blanc provoqués par un — voisin de <i>C. kutscheri</i> . . . . .	468
— Etude du type fermentaire par chromatographie sur papier. . . . .	647
<i>Cultures de tissus</i> . Effet des produits d'hydrolyse enzymatique du sérum de poulain sur la croissance des cellules HeLa . . . . .	766
<i>Cyclosérine</i> . Répartition de la — dans le sérum et les viscères chez le chimpanzé, le rhesus, le cynocéphale, le papion, le lapin, le cobaye et la poule . . . . .	563
— Voir aussi <i>B. tuberculeux</i> .	
<i>Cystéamine</i> . Voir <i>Radioprotection</i> .	
<i>Dysenterie</i> . Inoculation conjonctivale au cobaye de bacilles dysen- tériques. . . . .	463
<i>Electrophorèse</i> . Dénombrement et propriétés des globulines du blanc d'œuf par — . . . . .	102
— Voir aussi <i>Toxine</i> .	

<i>Encéphalomyélites</i> . Position particulière des — de type Mengo par rapport aux poliomyélites . . . . .	142
<i>Fièvre aphteuse</i> . Infectivité en cultures de tissus de reins de porc . . . . .	81
<i>Gelée royale</i> . Pouvoir microbicide pour le b. de Koch. Fractionnement du principe actif . . . . .	272
<i>Grippe</i> . Action de la ribonucléase sur la multiplication du virus de la — . . . . .	772
<i>Immunochimie</i> . Dénombrement et propriétés des globulines du blanc d'œuf par l'étude immunochimique . . . . .	102
<i>INH</i> . Voir <i>B. tuberculeux</i> , <i>Mycobactéries</i> .	
<i>Lysogénie</i> . Les types physiologiques liés aux mutations du prophage chez les bactéries lysogènes défectives . . . . .	724
<i>Malleomyces pseudomallei</i> . Extraction et premiers essais de purification de l'antigène d'enveloppe K . . . . .	376
<i>Méthionine</i> . Nouveau milieu de culture pour le dosage microbiologique de la — . . . . .	671
<i>Milieux de culture</i> . Identification rapide des bacilles Gram-négatifs des urines sur — Tergitol 7 TTC . . . . .	803
<i>Mosaïque du tabac</i> . Structure et propriétés des particules élémentaires ; résultats obtenus au moyen des hautes pressions . . . . .	309
<i>Mycobactéries</i> . Cytochromes et activité cytochrome-oxydasique des — sensibles et résistantes à l'INH . . . . .	281
— Activité amino-acide-oxydasique des — sensibles et résistantes à l'INH . . . . .	695
— Détermination de — au moyen de l'œil du lapin . . . . .	795
<i>Pasteurella</i> . Etude bactériologique de souches isolées d'animaux des espèces porcine et ovine . . . . .	251
— Une nouvelle — isolée d'abcès pulmonaires du rat blanc . . . . .	800
<i>Peroxyde</i> . Comparaison entre l'action létale et mutagène d'un — organique et des radiations sur <i>E. coli</i> . . . . .	366
<i>Phascolus vulgaris</i> . Activité immunologique et physiologique des extraits de — — . . . . .	602
<i>Poliomyélite</i> . L'antigène poliomyélitique au cours du développement intracellulaire du virus . . . . .	225
<i>Prophage</i> . Voir <i>Lysogénie</i> .	
<i>Prolysines</i> . Voir <i>Bactériophage</i> .	
<i>Protéinase</i> . Caractère contingent de la sécrétion de — chez certaines espèces du genre <i>Sarcina</i> . . . . .	663
<i>Proteus vulgaris</i> . L'hydrolyse de l'urée par — — . . . . .	805
<i>Pseudomonadaceae</i> . Systématique . . . . .	397
<i>Radiations</i> . Voir <i>Peroxyde</i> .	
<i>Radioprotection</i> . Mécanisme de l'activité radioprotectrice de la cystéamine chez les bactéries . . . . .	456
<i>Rage</i> . Comportement en culture du tissu cérébral infecté par le virus rabique . . . . .	30
— La — humaine au Nord-Vietnam en 1955 . . . . .	135

— Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1956. . . . .	300
— Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur de Hanoï en 1955. . . . .	304
— Etudes expérimentales sur la rage en Ethiopie . . . . .	475
— Réaction du hérisson à l'inoculation du virus rabique . . . . .	489
<i>Ribonucléase</i> . Voir <i>Grippe</i> .	
<i>Salmonella</i> . Nouveau type isolé au Congo belge, <i>S. businga</i> . . . . .	791
<i>Sang</i> . Identification du — humain . . . . .	592
<i>Sérum</i> . Etude du — d'un sujet atteint d'hyperlipémie essentielle. . . . .	269
<i>Sol</i> . Equilibre climacique et minéralisation humique . . . . .	517
<i>Staphylocoques</i> . Antigénotherapie spécifique dans le traitement des staphylococcies rebelles et récidivantes . . . . .	13
<i>Taxonomie</i> . Position taxonomique de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> et de <i>Coccus P</i> . . . . .	663
— Position taxonomique de <i>Micrococcus mycetoides</i> Castellani 1942, agent de l'ulcère tropicaloïde . . . . .	786
<i>Teschen</i> . Virulence des centres nerveux de porcelets inoculés de virus de — . . . . .	230
— Culture du virus de — sur cellules épithéliales de rein de porc. . . . .	581
<i>Toxine</i> . Effets de la — R2 du bacille typhique sur la formule leucocytaire . . . . .	91
— Influence de la nature électrophorétique de l'antitoxine antidiphthérique de cheval sur la forme de la courbe de précipitation quantitative . . . . .	246
— Action toxique expérimentale de la — R2 du bacille typhique : action sur la glycémie . . . . .	390
<i>Tréponème</i> . Action des antibiotiques sur le — de Reiter . . . . .	435
— Milieu de survie pour les — pâles utilisable pour le test de Nelson . . . . .	539
— Détermination des acides volatils de fermentation par chromatographie . . . . .	656
<i>Ulcère tropicaloïde</i> . Voir <i>Taxonomie</i> .	
<i>Vaccine</i> . L'action cytopathogène du virus vaccinal en culture de tissus . . . . .	218
<i>Vibrions</i> . Essais d'exaltation du pouvoir toxique de <i>V. cholerae</i> . I et II . . . . .	406 et 532
— Etude immunochimique de — d'avortements bovins . . . . .	683
<i>Viomycine</i> . Voir <i>B. tuberculeux</i> .	
<i>Virus</i> . Action des hautes pressions sur les — ; variations avec la température . . . . .	69
— Voir aussi aux différents virus.	
<i>Vitamines</i> . Dosage microbiologique des — B <sub>3</sub> et B <sub>5</sub> . . . . .	792

# TABLE DES OUVRAGES PRÉSENTÉS OU REÇUS

(TOME 93)

ANDRÉ-THOMAS (J.). — <i>Exposés actuels de biologie cellulaire. Les facteurs de la croissance cellulaire</i> . . . . .	151
ARON (M.) et GRASSÉ (P.). — <i>Précis de biologie animale</i> (5 <sup>e</sup> édit.).	279
<i>Biological aspects of the transmission of diseases</i> . . . . .	544
BOOTH (V. H.). — <i>Carotene: its determination in biological materials</i> . . . . .	544
BRAY (H. G.) et WHITE (K.). — <i>Kinetics and thermodynamics in biochemistry</i> . . . . .	279
CAZAL (P.). — <i>Erythrocytes et érythropathies</i> . . . . .	811
CHADLI (A.). — <i>Contribution à l'étude histopathologique et cytologique du sarcome plasmocytaire du squelette: myélome plasmocytaire et sarcome plasmocytaire solitaire</i> . . . . .	680
<i>Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. Vol. X. Regulation and mode of action of thyroid hormones</i> . . . . .	418
<i>Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. Vol. XI. Hormones in blood</i> . . . . .	812
<i>Ciba Foundation Symposium on the chemistry and biology of purines</i> . . . . .	280
<i>Ciba Foundation Symposium on the nature of viruses</i> . . . . .	150
<i>Conférences d'actualités pratiques de la Faculté de Médecine de Paris</i> . . . . .	679
CONWAY (E. J.). — <i>Microdiffusion analysis and volumetric error</i> (4 <sup>e</sup> édit.). . . . .	812
<i>Hormones, brain function and behavior</i> . . . . .	151
HOUBEN-WEYL. — <i>Methoden der organischen Chemie. Vol. XI, 1<sup>re</sup> partie. Stickstoffverbindungen II. Herstellung von Aminen.</i>	812
<i>Instinct (L') dans le comportement des animaux et de l'homme.</i>	543
IRVING (J. T.). — <i>Calcium metabolism</i> . . . . .	680
JAMES (A. H.). — <i>The physiology of gastric digestion</i> . . . . .	151
KAUFMANN (H. P.). — <i>Médicaments de synthèse</i> . . . . .	543
<i>Lectures on the scientific basis of medicine</i> . . . . .	544
LEFF (S.). — <i>Recent outbreaks of infectious diseases</i> . . . . .	679
MASON (A. S.). — <i>Introduction to clinical endocrinology</i> . . . . .	678
MATTHEWS (R. E. F.). — <i>Plant virus serology</i> . . . . .	419
MEISTER (A.). — <i>Biochemistry of the amino acids</i> . . . . .	811
MORRIS (J. N.). — <i>Uses of epidemiology</i> . . . . .	678
<i>Physiopathology of the reticulo-endothelial system</i> . . . . .	680



POLICARD (A.), BESSIS (M.) et LOCQUIN (M.). — <i>Traité de microscopie.</i> <i>Instruments et techniques</i> . . . . .	150
PRICE (B. T.), HORTON (C. G.) et SPINNEY (K. T.). — <i>Radiation</i> <i>shielding</i> . . . . .	679
PUNDEL (J. P.). — <i>Acquisitions récentes en cytologie vaginale</i> <i>hormonale</i> . . . . .	419
<i>Report of the medical Research Council for the year 1955-1956</i> . .	811
SPRIGGS (A. I.). — <i>The cytology of effusions in the pleural, peri-</i> <i>cardial and peritoneal cavities</i> . . . . .	679
TAYLOR (I.) et KNOWELDEN (J.). — <i>Principles of epidemiology</i> . .	280
<i>Thromboses, antibiothérapie, maladies avec auto-anticorps.</i> <i>XXX<sup>e</sup> Congrès Français de Médecine, Alger, 1955</i> . . . .	280
TURPIN (R.) et VELU (H.). — <i>Thérapeutique antibiotique</i> . . . .	419

---

Le Gérant : G. MASSON.



